

Die Funktion von Ssl11 und PurA von *Staphylococcus aureus* bei der Komplementevasion

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)



vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Humanbiologin
Anika Westphal

geboren am 17.11.1988 in Teterow

Gutachter:

1) Prof. Dr. Peter F. Zipfel

Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V.
Hans-Knöll-Institut
Abteilung Infektionsbiologie
Beutenbergstraße 11a
07745 Jena

2) Prof. Dr. Andreas Henke

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Universitätsklinikum Jena
Institut für Virologie und Antivirale Therapie
Hans-Knöll-Straße 2
07745 Jena

3) PD Dr. Knut Ohlsen

Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
Josef-Schneider-Straße 2
97080 Würzburg

Datum der öffentlichen Disputation:

12. 09. 2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	V
Summary.....	VII
1. Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Das Komplementsystem	1
1.1.2 Die Komplementaktivierung	2
1.1.2.1 Der klassische Weg der Komplementaktivierung	2
1.1.2.2 Der Lektin-Weg der Komplementaktivierung.....	2
1.1.2.3 Der alternative Weg der Komplementaktivierung	4
1.1.3 Die Effektorfunktionen des Komplements.....	4
1.1.3.1 Die Aktivierung und Amplifizierung der C3-Konvertasen.....	4
1.1.3.2 Die Anaphylatoxine.....	4
1.1.3.3 Die Opsonophagozytose	6
1.1.3.4 Die Aktivierung der C5-Konvertase und die Ausbildung des terminalen Komplementkomplexes	6
1.1.4 Regulatoren des Komplements	6
1.1.4.1 Faktor H und Faktor H-verwandte Proteine.....	8
1.1.4.2 Plasminogen.....	10
1.1.5 Phagozytose durch neutrophile Granulozyten	11
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.2.1 Virulenz von <i>S. aureus</i>	13
1.2.1.1 Regulation der Genexpression von Virulenzfaktoren	13
1.2.1.2 Virulenzmechanismen von <i>S. aureus</i>	14
1.2.1.3 <i>S. aureus</i> und Komplementevasion	16
1.2.1.3.1 <i>S. aureus</i> und der TCC.....	18
1.2.1.4 Phagozytose von <i>S. aureus</i> durch Neutrophile und Evasionsmechanismen	18
1.2.2 Superantigene und Superantigen-ähnliche Proteine (Ssls)	20
1.2.2.1 Regulation der Expression von Ssls	22
1.2.2.2 Ssls sind Virulenzproteine	22
1.2.2.3 Ssl11	23

1.2.3 PurA - ein <i>moonlighting</i> Protein von <i>S. aureus</i>	25
1.3 Ziel des Promotionsprojektes	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Chemikalien	27
2.2 Mikroorganismen und Zellen	27
2.3 Medien	27
2.4 Kultivierung von Mikroorganismen und Zellen	28
2.5 Proteine	28
2.6 Proteinexpression und -reinigung von Ssl11	29
2.7 Antikörper und Antiseren	30
2.8 Mutantenerstellung durch Phagentransduktion	30
2.9 PCR und Agarose-Gelelektrophorese	31
2.10 Proteinarray	32
2.11 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	33
2.12. Proteinbiotinylierung und Affinitätsbestimmung via Biolayer Interferometrie	34
2.13 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.14 Western Blot	35
2.15 Silberfärbung	36
2.16 Komplementaktivierungsassay des alternativen Weges	36
2.17 Kofaktorassay	36
2.18 Plasmin(ogen)-Spaltung von S-2251, C3b und Fibrinogen	37
2.19 Lokalisierung von Ssl11	37
2.20 Bindung von Faktor H und Plasminogen an <i>S. aureus</i>	39
2.21 C3b-Deposition auf der <i>S. aureus</i> Oberfläche	39
2.22 Phagozytose von <i>S. aureus</i> durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten	40
2.23 Überlebensassay	41
2.24 Statistische Methoden	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Rekrutierung von Faktor H durch Ssl11 und PurA	42
3.1.1 Ssl11 und PurA sind Faktor H-bindende Proteine von <i>S. aureus</i>	42
3.1.2 Ssl11 und PurA binden verschiedene Faktor H-Regionen	45

3.1.3 Die Bindung von Ssl11 und PurA an Faktor H ist abhängig von der Ionenstärke	47
3.1.4 PurA bindet Faktor H, FHL-1 und CFHR1.....	48
3.1.5 Ssl11 reduziert die C3b- und C5b-9 Deposition	49
3.1.6 Rekrutiertes Faktor H und FHL-1 fungieren als Kofaktor für die Protease Faktor I	50
3.2 Rekrutierung von Plasminogen durch Ssl11 und PurA.....	52
3.2.1 Ssl11 und PurA binden Plasminogen.....	52
3.2.2 Die mit ϵ ACA-inhibierbare Bindung von Ssl11 und PurA an Plasminogen ist abhängig von der Ionenstärke	54
3.2.3 Der Aktivator uPa spaltet Plasminogen, das an Ssl11 und PurA gebunden ist, zu aktivem Plasmin	55
3.2.4 Die Staphylokinase aktiviert Plasminogen, das an Ssl11 und PurA gebunden ist	58
3.3 Ssl11 inhibiert Komplement	61
3.3.1 Ssl11 rekrutiert parallel Faktor H und Plasminogen	61
3.3.2 Ssl11 ist auf der Oberfläche von <i>S. aureus</i> lokalisiert	62
3.3.3 Ssl11 rekrutiert Faktor H an die Oberfläche von <i>S. aureus</i>	66
3.3.4 Ssl11 reduziert die C3b-Deposition auf der <i>S. aureus</i> Oberfläche	66
3.3.5 Makrophagen phagozytieren C3b-opsonisierte <i>S. aureus</i>	67
3.3.6 Ssl11 reduziert die Phagozytose von <i>S. aureus</i> durch neutrophile Granulozyten	68
3.4 Ssl11 beeinflusst die Virulenz <i>in vivo</i>	73
4. Diskussion	74
4.1 Ssl11 und PurA binden den funktionell aktiven Komplementregulator Faktor H	74
4.2 Ssl11 und PurA binden den funktionell aktiven Komplementregulator Plasmin(ogen)	77
4.3 PurA ist ein <i>moonlighting</i> Protein	81
4.4 Der Komplementinhibitor Ssl11 beeinflusst die Opsonophagozytose	83
4.5 Die Rolle von Ssl11 und PurA als Virulenzproteine <i>in vivo</i>	86
4.6 Fazit.....	88
Literaturverzeichnis	90
Eigenständigkeitserklärung.....	103
Lebenslauf	104
Konferenzbeiträge und Publikationen	105
Danksagung.....	107

Abkürzungsverzeichnis

εACA	ε-Aminocapronsäure
Agr	<i>accessory gene regulator</i>
AIP	<i>auto inducer peptide</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
Aur	Aureolysin
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BL	<i>BacLight</i>
BSA	bovines Serumalbumin
C1INH	C1 Inhibitor
C3aR	C3a Rezeptor
C5aR	C5a Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFHR1	<i>complement factor H related protein 1</i>
CHIPS	<i>chemotaxis inhibitory protein of staphylococci</i>
Clf	<i>clumping factor</i>
CR	<i>complement receptor</i>
CRASP	<i>complement regulator acquiring surface protein</i>
DAF	<i>decay accelerating factor</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
Eap	<i>extracellular adherence protein</i>
Ecb	<i>extracellular complement binding protein</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ecb	<i>extracellular complement binding protein</i>
Efb	<i>extracellular fibrinogen binding protein</i>
Emp	<i>extracellular matrix protein</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FcR	Fc Rezeptor
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FH	Faktor H
FHL1	<i>Factor H like protein 1</i>
Fnbp	Fibronektin bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Gpd2	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase 2
Gr	Gramicidin
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Sodium</i>
HRP	Merrettichperoxidase
iC3b	inaktives C3b
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNHS	inaktiviertes normales humanes Serum
IMP	Inosinmonophosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

ka	Assoziationsrate
KCl	Kaliumchlorid
kd	Dissoziationsrate
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MASP	<i>mannose-binding lectin-associated serine protease</i>
MBL	Mannose bindendes Lektin
MCP	<i>membrane cofactor protein</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
n.u.	nicht untersucht
NaCl	Natriumchlorid
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NHS	normales humanes Serum
OB	<i>oligosaccharid binding</i>
OD	optische Dichte
P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGL	Peptidoglykan
Plg	Plasminogen
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PSGL	P-Selektin Glykoprotein Ligand
PVL	Panton-Valenton-Leukocidin
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Rot	<i>repressor of toxin</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S-2251	H-D-Valyl-L-Leucyl-L-Lysin p-Nitroanilin Dihydrochlorid
SA	Standardabweichung
Sae	<i>S. aureus</i> Exoprotein Expression
SAK	Staphylokinase
SaPI	<i>Staphylococcus aureus pathogenicity Island</i>
Sbi	<i>second binder of immunoglobulin</i>
SCIN	<i>staphylococcal complement inhibitor</i>
SCR	<i>short consensus repeat</i>
SdrE	<i>serine-aspartate repeat protein E</i>
sek	Sekunde
sLacNac	Sialyllactosamin

Sle ^x	Sialyl Lewis X
Spa	Protein A
Ssl	<i>secreted superantigen like</i>
SSSS	<i>staphylococcal scalded skin syndrome</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCC	terminaler Komplementkomplex
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor Rezeptor
tPa	<i>tissue plasminogen activator</i>
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
TSST	<i>toxic shock syndrome toxin</i>
üN	über Nacht
uPa	Urokinase Plasminogenaktivator
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
WTA	<i>wall teichoic acid</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Der Aufbau des Komplementsystems.....	3
Abbildung 1.2: Das Komplementprotein C3 und dessen Spaltprodukte.....	5
Abbildung 1.3: Der Aufbau von Faktor H und Faktor H-verwandten Proteinen.....	9
Abbildung 1.4: Der Aufbau des Plasminogens.....	10
Abbildung 1.5: Übersicht über Virulenzproteine von <i>S. aureus</i>	16
Abbildung 1.6: Der Aufbau von Superantigenen und Ssls.....	21
Abbildung 1.7: Ssl11 besteht aus einer OB- und einer β -grasp-Domäne.....	24
Abbildung 3.1: Ssl11 und PurA binden Faktor H.....	42
Abbildung 3.2: Rekombinante Expression und Reinigung von Ssl11.....	43
Abbildung 3.3: Ssl11 und PurA binden Faktor H konzentrationsabhängig.....	44
Abbildung 3.4: Lokalisierung der Faktor H-Binderegion für Ssl11 und PurA.....	46
Abbildung 3.5: Die Ionenstärke beeinflusst die Bindung von Ssl11 und PurA an Faktor H...47	
Abbildung 3.6: PurA bindet humanes FHL-1 und CFHR1.....	48
Abbildung 3.7: Ssl11 reduziert die C3b und C5b-9-Deposition.....	49
Abbildung 3.8: Faktor H und FHL-1, gebunden an Ssl11 und PurA agieren als Kofaktor für die Protease Faktor I.....	51
Abbildung 3.9: Ssl11 bindet Plasminogen.....	52
Abbildung 3.10: Ssl11 und PurA binden Plasminogen.....	53
Abbildung 3.11: ϵ ACA und NaCl beeinflussen die Bindung von Ssl11 und PurA an Plasminogen.....	54
Abbildung 3.12: Plasminogen, welches an Ssl11 und PurA gebunden ist, wird durch uPa zu Plasmin konvertiert.....	55
Abbildung 3.13: Durch Ssl11 und PurA gebundenes Plasmin(ogen) spaltet Fibrinogen und das Komplementprotein C3b.....	57
Abbildung 3.14: Die Staphylokinase aktiviert an Ssl11 und PurA gebundenes Plasminogen.....	59
Abbildung 3.15: Die mikrobielle Expression der SAK unterstützt die Spaltung von Fibrinogen und C3b durch Plasmin(ogen).....	60
Abbildung 3.16: Ssl11 bindet zeitgleich Faktor H und Plasminogen.....	62
Abbildung 3.17: Die <i>S. aureus</i> Mutanten Newman Δspa , $\Delta spa\Delta ssl11$ und $\Delta spa\Delta sbi$ weisen gegenüber dem Wildtyp eine Wachstumsdefizienz auf.....	63
Abbildung 3.18: Ssl11 wird sekretiert und bindet zusätzlich an die Oberfläche von <i>S. aureus</i>	65
Abbildung 3.19: Die Ssl11-Mutante bindet weniger Faktor H auf der <i>S. aureus</i> Oberfläche.....	66
Abbildung 3.20: Ssl11 reduziert die C3b-Deposition auf der Oberfläche von <i>S. aureus</i>	67
Abbildung 3.21: Die Phagozytose von <i>S. aureus</i> durch humane Makrophagen ist nicht durch Ssl11 beeinflusst.....	68
Abbildung 3.22: Die Phagozytose von <i>S. aureus</i> durch neutrophile Granulozyten ist in Anwesenheit von Ssl11 verringert.....	69
Abbildung 3.23: <i>S. aureus</i> wird von neutrophile Granulozyten phagozytiert und adhärert in geringem Maß an die phagozytischen Zellen.....	71
Abbildung 3.24: Ssl11 trägt in geringem Maß zur Virulenz von <i>S. aureus</i> bei.....	73
Abbildung 4.1: Ssl11 und PurA sind Komplementevasionsproteine von <i>S. aureus</i> und haben Einfluss auf die Virulenz.....	89

Zusammenfassung

Jährlich erkranken etwa 19 Millionen Menschen weltweit an einer Sepsis. Einer der häufigsten Erreger einer Sepsis ist *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Aufgrund der hohen Anpassungsfähigkeit an die sich stets verändernde Umwelt entwickeln Staphylokokken sehr schnell Resistenzen gegen Antibiotika. Die Therapie einer *S. aureus* Infektion ist daher nach wie vor problematisch. Der Erreger *S. aureus* zeichnet sich durch eine Vielzahl von Virulenzproteinen aus. Diese ermöglichen die Adhäsion und Invasion des Bakteriums an und in humane Wirtszellen und vermitteln Schutz des Bakteriums gegenüber der humanen Immunantwort. Das Komplementsystem als Teil der angeborenen Immunantwort stellt eine erste Barriere gegen eingedrungene Erreger dar. Da Komplement neben schädigenden Erregern auch durch körpereigene Zellen aktiviert wird, besitzt der Mensch regulatorische Proteine zum Selbstschutz. Eine Strategie von Mikroorganismen, die humane Immunantwort zu umgehen, indem sie nicht als körperfremd erkannt werden, besteht darin, diese Komplementregulatoren durch Virulenzproteine zu rekrutieren.

Ssl11 und PurA, zwei *S. aureus* Proteine mit Einfluss auf die humane Wirtsantwort, waren Fokus dieser Arbeit. Das superantigenähnliche Protein Ssl11 und das ursprünglich als Purinbiosynthese-Protein identifizierte PurA wurden hinsichtlich einer putativen Rekrutierung der humanen, im Plasma abundanten Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen charakterisiert. Sowohl das sekretierte Ssl11, als auch das ursprünglich im Zytosol gefundene PurA sind zudem auf der Oberfläche von *S. aureus* lokalisiert. Dies ermöglicht die Bindung humaner Proteine zu Zwecken der Immunevasion und charakterisiert PurA zudem als *moonlighting* Protein von *S. aureus*.

Ssl11 bindet Faktor H, welcher in gebundenem Zustand seine Kofaktoraktivität für Faktor I und damit seine komplementregulatorische Funktion beibehält. PurA rekrutiert sowohl Faktor H als auch die Faktor H-ähnlichen Proteine *factor H like protein 1* (FHL-1) und *complement factor H related protein 1* (CFHR1). PurA gebundener Faktor H wie auch FHL-1 agieren, ebenso wie bei Ssl11, als Kofaktoren und weisen somit komplementregulatorische Aktivität auf. Während Ssl11 Faktor H über einen neuartigen, bisher unbekannten Mechanismus bindet, weist PurA Bindestellen in den SCRs 1-7 und SCRs 18-20 von Faktor H auf, welche zuvor bereits für andere Virulenzproteine von *S. aureus* identifiziert wurden.

Ssl11 und PurA binden weiterhin den Komplementregulator Plasminogen. Das mikrobiell-rekrutierte Plasminogen wird durch humanes uPa zu proteolytisch aktivem Plasmin umgesetzt. *S. aureus* exprimiert zudem einen eigenen Plasminogen-Aktivator, die Staphylokinase, welche mikrobiell gebundenes Plasminogen ebenfalls aktiviert. Ssl11- und PurA-rekrutiertes Plasmin(ogen) spaltet das humane extrazelluläre Matrixprotein Fibrinogen, was die Gewebsinvasion und Ausbreitung von *S. aureus* im menschlichen Wirt fördert. Plasmin(ogen) im Komplex mit mikrobiellem Ssl11 oder PurA spaltet weiterhin das Komplementprotein C3b.

Die Rekrutierung von sowohl Faktor H als auch Plasmin(ogen) durch *S. aureus* führt zur Spaltung von C3b, welches auf der mikrobiellen Oberfläche abgelagert wird. Ssl11 verringert durch die Rekrutierung der Regulatoren die Amplifikation der C3-Konvertase und inhibiert somit die Aktivierung des alternativen Komplementweges. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Ssl11 weniger abgelagertes C3b auf der Staphylokokken Oberfläche nachweisbar und die Phagozytose von *S. aureus* durch Neutrophile verringert ist.

Die Virulenzattenuierung von Ssl11- und PurA-defizienten *S. aureus* in der Wachsmottenlarve *G. mellonella* zeigt erstmals, dass Ssl11 und PurA die Immunantwort im lebenden Wirt zugunsten des Erregers *S. aureus* beeinflussen.

Summary

Every year about 19 million people worldwide fall ill to a sepsis. One of the most common pathogens of a sepsis is *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Due to the high adaptability to the changing environment staphylococci develop resistances against antibiotics very fast. Because of this, therapy of *S. aureus* infections remain difficult to this day. *S. aureus* stands out due to its large number of virulence factors. These enable adhesion to and invasion of human host cells and protect the bacterium against the human immune response. The complement system as part of the innate immune response serves as a first barrier against invading pathogens such as *S. aureus*. However, the complement system cannot only be activated by harmful bacteria but also by regular human cells. Therefore, regulatory proteins exist to protect self surfaces. One strategy of microorganisms, like *S. aureus*, to evade the human immune response by not being recognized as foreign, is the recruitment of these complement regulators via virulence proteins.

Ssl11 and PurA, two *S. aureus* proteins that influence the human host response were subject of this thesis. The superantigen-like Ssl11 and PurA, which was originally identified as a purin biosynthesis protein were characterized regarding a putative recruitment of the human, plasma-abundant, complement regulators Factor H and plasminogen. Both the secreted Ssl11 as well as PurA that was originally localized in the cytosol are also located at the surface of *S. aureus*. This enables the binding of human proteins for immune evasion and characterizes PurA as a moonlighting protein of *S. aureus*.

Ssl11 binds Factor H which - in its bound state - retains its cofactor activity for Factor I and thereby its complement regulatory function. PurA recruits Factor H as well as the 'Factor H-like protein 1' (FHL-1) and 'Complement Factor H related protein 1' (CFHR1). Similar to Ssl11, PurA-bound Factor H as well as FHL-1 also act as cofactors and possess complement regulatory activity. Ssl11 binds Factor H via a novel, so far uncharacterized mechanism, while PurA exhibits binding sites in the SCRs 1-7 and SCRs 18-20 of Factor H that were already verified for other virulence proteins of *S. aureus*.

In addition both Ssl11 and PurA bind the complement regulator plasminogen. The microbial-recruited plasminogen can be activated to proteolytically active plasmin by human uPa. Furthermore, *S. aureus* expresses its own plasminogen activator, the

staphylokinase, which also activates microbial bound plasminogen very effectively. Ssl11- and PurA-recruited plasmin(ogen) cleaves the human extracellular matrix protein fibrinogen and that in turn promotes tissue invasion and spreading of *S. aureus* in the human host. Moreover plasmin(ogen) in complex with the microbial proteins cleaves the complement protein C3b.

The recruitment of both Factor H and plasmin(ogen), causes cleavage of C3b which is deposited at the microbial surface. Due to the recruited regulators Ssl11 decreases the amplification of the C3-convertase and thereby inhibits the activation of the alternative complement pathway. In presence of Ssl11 less deposited C3b was detectable at the staphylococcal surface and the phagozytosis of *S. aureus* by neutrophils was decreased.

The virulence attenuation of Ssl11- and PurA-deficient *S. aureus* in the wax moth larvae *G. mellonella* demonstrates that Ssl11 and PurA influence the immune response in the living host in favor of the pathogen *S. aureus*.

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der Mikrobiologe und Mediziner Robert Koch identifizierte 1882 erstmalig Mikroorganismen als Krankheitserreger. Zusammen mit Edward Jenner, Louis Pasteur, Emil Behring, Paul Ehrlich und Jules Bordet legte er den Grundstein für ein Verständnis des Immunsystems und der Pathogenität von Mikroorganismen sowie erste Ansätze der Therapie durch Vakzinierung. Heutzutage ist insbesondere die Interaktion der pathogenen Erreger mit dem humanen Immunsystem des Wirts im Fokus aktueller Forschung.

Das humane Immunsystem ist ein hochkomplexes Abwehrsystem gegen eindringende Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren und Pilze. Hier werden zwei grundlegende Mechanismen unterschieden: die schnell agierende Immunantwort des angeborenen Immunsystems, welches evolutionär sehr konserviert ist. Dazu gehören das Komplementsystem, antimikrobielle Peptide sowie phagozytisch wirksame Zellen, wie Makrophagen und Neutrophile. Dagegen stellt die adaptive Immunität ein spezifischeres System dar, realisiert durch B- und T-Zellen und die Bildung hochspezifischer Antikörper. Die Reaktion der adaptiven Immunantwort verläuft in der Konsequenz langsamer als die der angeborenen Immunität, dafür kommt es nach Erstkontakt mit dem Pathogen zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, um bei erneuter Infektion mit dem gleichen Pathogen eine schnelle und effektive Immunantwort zu erreichen.

1.1.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem als Teil des angeborenen Immunsystems wurde 1897 zeitgleich von Paul Ehrlich und Jules Bordet entdeckt. Während Ehrlich es in seiner Seitenkettentheorie beschrieb und somit auch den Begriff „Komplement“ prägte (Ehrlich 1897), beschrieb Bordet Komplement als hitzelabile Komponente im humanen Blutserum (Zipfel und Skerka 2009). Als Teil des angeborenen Immunsystems stellt das Komplement ein erstes, schnell aktivierbares, hochwirksames Abwehrsystem gegenüber eindringenden Erregern dar. Zu diesem System gehören mehr als 60 Plasmaproteine, die überwiegend in der Leber synthetisiert werden. Sie zirkulieren im Blut und werden dort kaskadenartig aktiviert (Walport 2001a). Die Initiation der Komplementaktivierung wird über drei Wege

realisiert. Diese resultieren in der Aktivierung und Amplifikation der C3-Konvertase, woraufhin auch die C5-Konvertase entsteht. Im letzten Schritt kommt es zur Assemblierung des terminalen Komplementkomplexes (*terminal complement complex*, TCC). Während früher lediglich die Abwehr von Mikroorganismen postuliert wurde, ist seit den 1970er Jahren bekannt, dass Komplement multiple Funktionen ausübt: so werden z. B. Zelltrümmer und apoptotische Zellen eliminiert, Komplement trägt zur Homöostase bei und stellt Signale für die adaptive Immunantwort zur Verfügung (Walport 2001a, 2001b; Zipfel und Skerka 2009).

1.1.2 Die Komplementaktivierung

Komplement wird über drei verschiedene Wege aktiviert: den klassischen Weg, den Lektin-Weg und den alternativen Weg (**Abb. 1.1**).

1.1.2.1 Der klassische Weg der Komplementaktivierung

Das Protein C1q bildet, zusammen mit den Proteasen C1r und C1s, den C1-Komplex. Der klassische Weg ist aktiviert, wenn C1q modifizierte körpereigene Oberflächen oder eine Erregeroberfläche über IgG1/ IgM-Antikörper erkennt und bindet. Diese Bindung resultiert in einer autokatalytischen Aktivierung der Protease C1r, welche wiederum die Protease C1s aktiviert. Liganden für C1s sind die Komplementproteine C4 und C2, welche in kleine (C4a, C2b) und große (C4b, C2a) Fragmente gespalten werden. Auf der Aktivatoroberfläche kommt es somit zur Generierung der C3-Konvertase des klassischen Weges, C4bC2b (Dunkelberger und Song 2010). Die C3-Konvertase spaltet das zentrale Komplementprotein C3 (Zipfel et al. 2013; Gaboriaud et al. 2004).

1.1.2.2 Der Lektin-Weg der Komplementaktivierung

Mannose-bindendes Lektin (MBL) und Fikoline sind die Initiatorstrukturen des Lektin-Weges. MBL und Fikoline sind strukturell dem C1q ähnlich. Sie stellen sogenannte Muster-Erkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) dar. Diese erkennen konservierte Strukturen, wie Endotoxine und Lipopolysaccharide (LPS) der gramnegativen Bakterien, Lipoteichonsäuren auf grampositiven Bakterien oder aber β -Glukane auf Hefen. Derartige konservierte Strukturen werden als pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) oder auch als mikrobiell-assoziierte molekulare Strukturen (MAMPs) bezeichnet. Auch Viren und Parasiten werden via MBL erkannt. MBL-assoziierte Serinproteasen

(MASPs) sind funktionell den Proteasen C1r und C1s sehr ähnlich. Nachdem die Pathgenoberfläche durch MBL detektiert wurde, wird MBL durch MASPs komplexiert, welche C2 und C4 in deren Fragmente spalten und die C3-Konvertase C4bC2a entsteht.

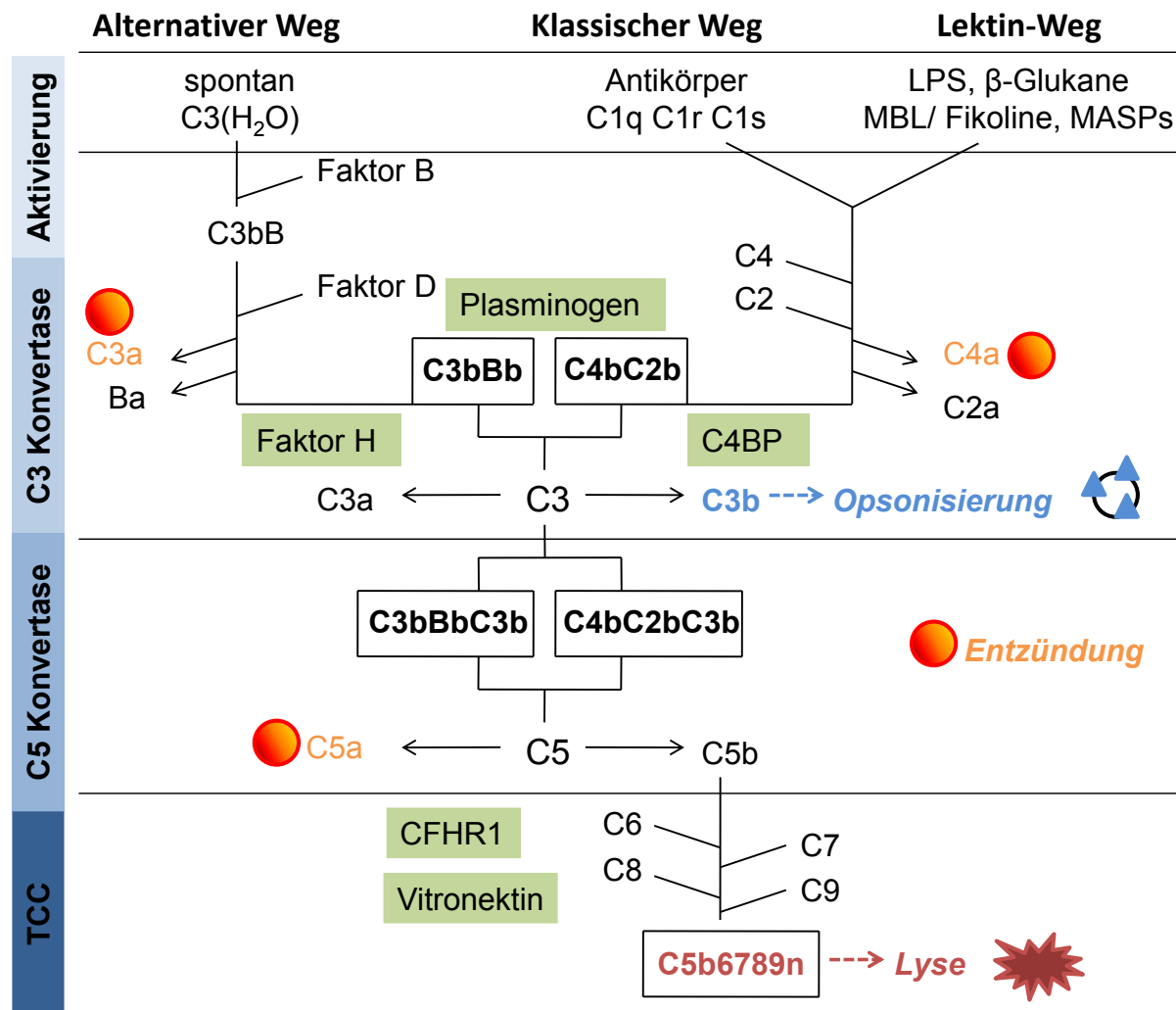


Abbildung 1.1: Der Aufbau des Komplementsystems. Das Komplementsystem wird in vier funktionelle Ebenen eingeteilt: die Aktivierung der Kaskade, die Aktivierung und Amplifikation der C3-Konvertase, die Aktivierung der C5-Konvertase und darauffolgend die Bildung des TCC. Die Aktivierung des Komplementsystems wird spontan über den alternativen Weg, insbesondere durch Antigen-Antikörper-Komplexe über den klassischen oder durch die Erkennung von Zuckerstrukturen, wie LPS, MBL und Fikoline auf mikrobiellen Oberflächen über den Lektin-Weg realisiert. Es kommt zur Ausbildung der C3-Konvertasen C3bBb und C4bC2b, welche das zentrale Komplementprotein C3 in das Opsonin C3b und das Anaphylatoxin und antimikrobielle Peptid C3a spalten. Durch Anlagerung des C3b an die bestehenden C3-Konvertasen werden die C5-Konvertasen C3bBbC3b und C4bC2bC3b gebildet. Diese spalten C5 in das Anaphylatoxin C5a und in C5b. Letzteres ist die Grundlage der Assemblierung des TCC und somit der Lyse des Erregers, indem sich C6 an C5b und sequentiell C7, C8 und viele C9-Moleküle an den C5b6-Komplex anlagern. Die Aktivierung des Komplements wird zum Schutz humaner Zellen auf vielerlei Ebenen durch regulatorisch wirksame Proteine, wie Faktor H und Plasminogen kontrolliert.

1.1.2.3 Der alternative Weg der Komplementaktivierung

Der alternative Weg wird durch eine spontane Hydrolyse von C3 im Plasma initiiert. Es entsteht das Spaltprodukt $C3(H_2O)$, welches an das Komplementprotein Faktor B bindet. Die Protease Faktor D spaltet gebundenes Faktor B in Ba und Bb, woraufhin durch Anlagerung von Bb die initiale C3 Konvertase des alternativen Weges, $C3(H_2O)Bb$ entsteht. Die Spaltung von C3 in C3a und C3b induziert die Ausbildung der vorherrschenden C3-Konvertase des alternativen Weges, C3bBb, durch Anlagerung des bereits erwähnten Faktor B sowie dessen Spaltung in Bb und Ba durch die Protease Faktor D (Dunkelberger und Song 2010; Zipfel et al. 2006).

Zudem sind mittlerweile weitere Wege bekannt, durch die die proteolytische Kaskade des Komplements aktiviert werden kann. Properdin bindet an mikrobielle Oberflächen und initiiert die Neusynthesen von C3-Konvertasen (Hourcade 2006; Spitzer et al. 2007). Weiterhin sind Koagulationsproteine, wie Kallikrein und Thrombin dazu befähigt, C3 und auch C5 zu spalten (Huber-Lang et al. 2006; Markiewski et al. 2007; Irmischer et al. 2017).

1.1.3 Die Effektorfunktionen des Komplements

1.1.3.1 Die Aktivierung und Amplifizierung der C3-Konvertasen

Die zwei durch die Initiatorwege des Komplements gebildeten C3-Konvertasen spalten C3 in ein kleines Fragment, C3a, welches ein Anaphylatoxin und antimikrobielles Peptid darstellt, sowie das größere C3b, welches unter anderem als Opsonin wirkt. C3 besteht aus einer α -Kette und einer β -Kette, welche durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (**Abb.1.2**). Durch die Prozessierung von C3 in C3a, einem Fragment der α -Kette, und C3b kommt es durch Konformationsänderungen zur Freilegung einer hochreaktiven Thioester-Verbindung. Diese reagiert sehr potent mit Hydroxylgruppen und Aminogruppen von Kohlenhydraten und Proteinen auf Erregeroberflächen, wobei stabile Verbindungen entstehen und das C3b als Opsonin kovalent an die mikrobielle Oberfläche gebunden wird (Zipfel et al. 2006).

1.1.3.2 Die Anaphylatoxine

Phagozyten exprimieren, neben den Rezeptoren für Opsonine, eine weitere Gruppe von Rezeptoren auf deren Oberfläche, die G-Protein gekoppelten C5a Rezeptoren (C5aR1, C5aR2) und den C3a Rezeptor (C3aR1). Wenn *complement receptor 1*

(CR1) C3b gebunden hat, kann die Phagozytose des Erregers nur dann stattfinden, wenn zugleich C5a durch den C5aR erkannt wurde. C3a und C5a sind Anaphylatoxine. Rezeptoren für diese sind zudem auch auf Endothel- und Mastzellen zu finden. C3a und C5a rekrutieren Immunzellen an den Ort der Infektion und lösen lokale Entzündungsreaktionen aus. So erhöhen sie die vaskuläre Permeabilität von Blutgefäßen und induzieren die Kontraktion glatter Muskelzellen. Dadurch gelangen Antikörper, Komplementproteine und auch Phagozyten schnell und effizient an den Ort der Entzündung (Nordahl et al. 2004; Haas und van Strijp 2007; Wetsel 1995).

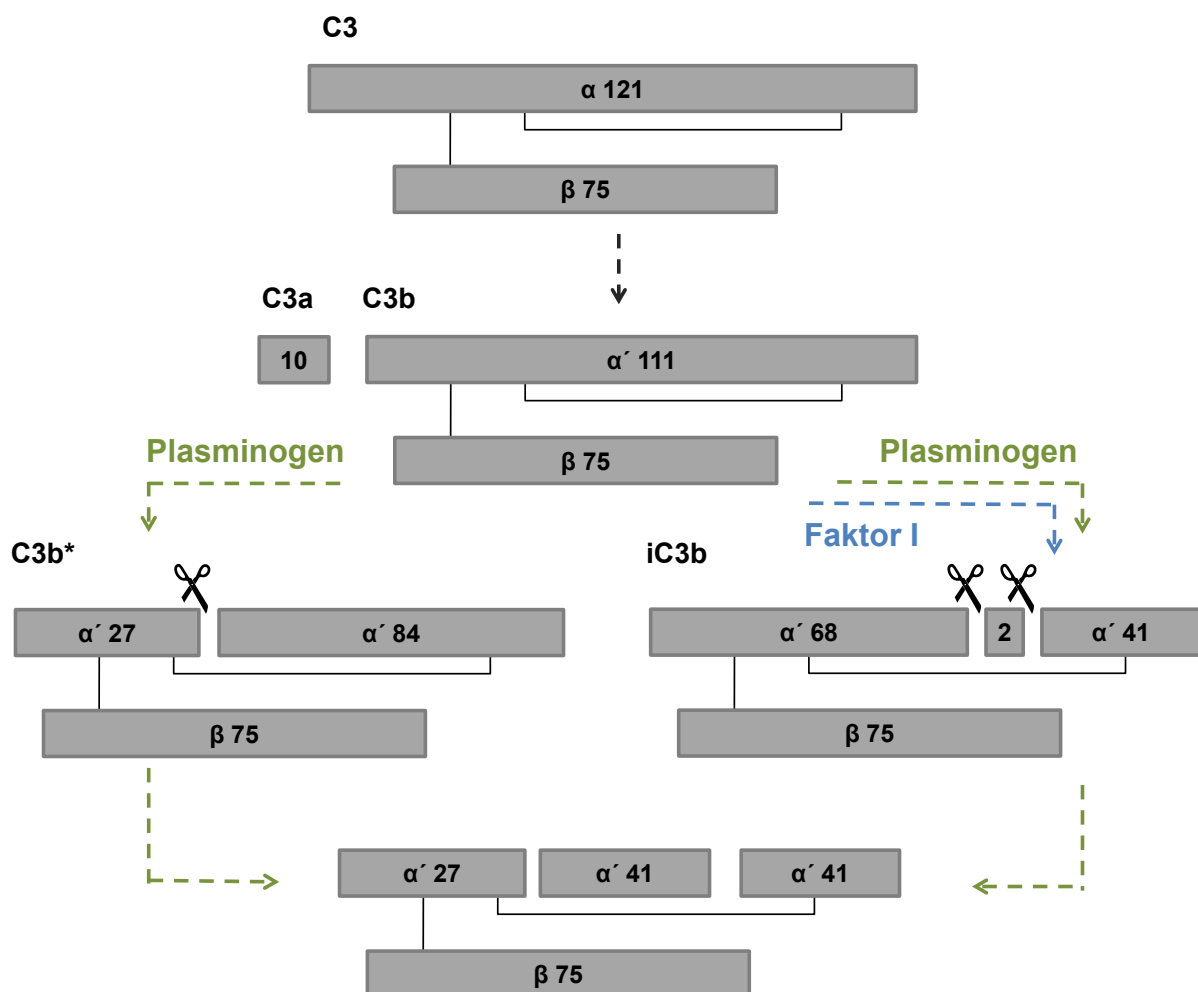


Abbildung 1.2: Das Komplementprotein C3 und dessen Spaltprodukte. Das Protein C3 besteht aus einer α-Kette und einer β-Kette, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Eine weitere Disulfidbrücke besteht innerhalb der α-Kette. Die Spaltung von C3 durch eine C3-Konvertase führt zur Abspaltung des Moleküls C3a. Es entsteht das C3b, welches aus der α'-Kette sowie der unmodifizierten β-Kette besteht. Die humane Serinprotease Faktor I spaltet C3b. Das entstandene inaktive C3b (iC3b) opsonisiert, wie C3b, komplementaktivierende Oberflächen, aber es steht nicht mehr zur Ausbildung einer C5-Konvertase zur Verfügung. Plasminogen ist ebenfalls ein Komplementregulator. Die aktivierte Protease Plasmin spaltet das Komplementprotein C3b. Dabei entstehen Zwischenprodukte mit einem Molekulargewicht von 68, 43 und 41 kDa sowie 84 und 27 kDa und finale Spaltprodukte von 27 und je 41 kDa (Koch et al. 2012).

1.1.3.3 Die Opsonophagozytose

Neben der Lyse ist die Opsonisierung von Mikroorganismen eine weitere Effektorfunktion des Komplements. C3b- und C4b-opsonisierte Erreger werden via CR 1-4 auf phagozytischen Zellen, wie Makrophagen, Monozyten und Granulozyten, erkannt. Verschiedene Rezeptoren erkennen jeweils spezifische Strukturen. So bindet CR1 C3b-opsonisierte Oberflächen, während CR3 und CR4 überwiegend die inaktive Form des C3b, das iC3b, detektieren. CR1g auf Makrophagen erkennt sowohl C3b als auch iC3b. Die Erkennung der Opsonine durch Komplementrezeptoren hat die Phagozytose des markierten Erregers und somit dessen Eliminierung zur Folge (Peiser 2009; Helmy et al. 2006).

1.1.3.4 Die Aktivierung der C5-Konvertase und die Ausbildung des terminalen Komplementkomplexes

Die Anlagerung von C3b an die C3-Konvertasen C4bC2a und C3bBb bewirkt die Entstehung der C5-Konvertasen C4bC2aC3b sowie C3bBbC3b. C5 wird durch die C5-Konvertase in das Anaphylatoxin C5a sowie das C5b gespalten (Ricklin et al. 2010). Letzteres ist essentiell für den Aufbau des TCC, welcher die Lyse von Erregern bewirkt. Das Fragment C5b bindet C6 und der entstandene kurzlebige Komplex C5b6 bindet wiederum C7. Aufgrund einer nun entstehenden Konformationsänderung im C5b67-Komplex kommt es zur Exposition einer hydrophoben Stelle innerhalb des gebundenen C7, welches sich daraufhin an Lipiddoppelmembranen anlagert. Somit wird der C5b67-Komplex auf der Erregeroberfläche positioniert. Im weiteren Verlauf binden das Komplementprotein C8 sowie zahlreiche C9-Moleküle an den bereits bestehenden Komplex. Da aufgrund der Anlagerung von C8 und C9-Proteinen ebenfalls Konformationsänderungen stattfinden, ermöglichen die entstandenen hydrophoben Stellen die Integration von C8 und C9-Proteinen in die Zellmembran des Erregers. Es kommt zur Ausbildung einer lytischen Pore. Dies hat zur Folge, dass u. a. die zelluläre Homöostase sowie der Protonengradient an der Membran gestört werden, was zum Tod des Erregers führt (Esser 1994; Dunkelberger und Song 2010).

1.1.4 Regulatoren des Komplements

Die hochreaktive Thioestergruppe des gespaltenen C3bs bindet nicht nur körperfremde, sondern auch humane Zelloberflächen. Zur Eliminierung von apoptotischen Zellen und Zelltrümmern ist Komplement elementar. Um gesunde,

humane Zellen vor dem Einfluss des Komplements zu schützen, stehen membran-gebundene wie lösliche Komplementregulatoren zur Verfügung. Im Folgenden sind lösliche wie membrangebundene Mediatorproteine genannt, welche Komplement auf unterschiedlichen Ebenen regulieren (**Abb. 1.1**).

Das lösliche Protein C1-Inhibitor (C1INH) kontrolliert die Aktivierung des Komplements im klassischen und Lektin-Weg, indem es die Dissoziation von C1r und C1s von C1q und von MASP-2 von MBL fördert (Davis et al. 2008). Neben der Inhibition der Aktivierung agieren viele Regulatoren auf Ebene der C3-Konvertasen. Während Faktor H C3b bindet, die Anlagerung von Faktor B verhindert und somit die Amplifizierung der Konvertase des alternativen Weges inhibiert, bindet C4BP das C4b und blockiert damit die Amplifizierung der C4bC2a-Konvertase. Zudem sind C4BP und Faktor H Kofaktoren für die Protease Faktor I, welche C3b in eine inaktive Form, das iC3b spaltet und somit die Komplementkaskade unterbricht (Jozsi und Zipfel 2008; Blom et al. 2004). Auch unter den membrangebundenen Komplementregulatoren gibt es Kofaktoren für Faktor I, welche die Inaktivierung von C3b und C4b fördern, das sogenannte Membran-Kofaktorprotein (*membrane cofactor protein*, MCP, auch *cluster of differentiation* 46, CD46) und CR1. Letzteres fördert zudem den Zerfall der bestehenden Konvertasen durch Anlagerung an C4b und C3b (Khera und Das 2009; Seya und Atkinson 1989). Dies ist auch die Funktion des membrangebundenen Zerfall-beschleunigenden Faktors (*decay accelerating factor*, DAF) (Turnberg und Botto 2003). Das Plasmaprotein Plasminogen hat ebenfalls komplementregulatorische Eigenschaften. Plasminogen wird via Aktivatoren in proteolytisch aktives Plasmin gespalten, welches C3b in inaktive Fragmente spaltet (**Abb. 1.2**) (Barthel et al. 2012a). Das membrangebundene CD59 und auch das lösliche Vitronektin sowie das Faktor H-ähnliche Protein 1 (CFHR1) inhibieren die Assemblierung des TCC (Preissner und Seiffert 1998; Kimberley et al. 2007; Heinen et al. 2009). CD59 verhindert die Anlagerung von C9 an den unvollständigen Komplex. CFHR1 inhibiert die Aktivität der C5-Konvertase, indem es das C3b der Konvertase bindet und somit die C5-Spaltung inhibiert (Heinen et al. 2009). Vitronektin bindet den C5b67-Komplex und inhibiert somit die Anlagerung des Komplexes in die Membran. Die derzeit einzigen bekannten Regulatoren, die das Komplementsystem positiv beeinflussen, sind Properdin und CFHR5. Die im alternativen Weg gebildete C3-Konvertase C3bBb ist labil und wird zeitnah abgebaut. CFHR5 bindet an Properdin und an beschädigte humane Endothelzellen und trägt zu

deren Beseitigung bei (Chen et al. 2016). Properdin stabilisiert die Konvertase durch Bindung um das Fünf- bis Zehnfache (Fearon 1975).

1.1.4.1 Faktor H und Faktor H-verwandte Proteine

Faktor H ist ein Regulator des alternativen Komplementweges und ein abundantes Plasmaglykoprotein, das vorwiegend in der Leber synthetisiert wird. Die Konzentration von Faktor H im Plasma beträgt etwa 500 µg/ml (Kristensen und Tack 1986; Ripoché et al. 1988). Faktor H hat ein Molekulargewicht von 150 kDa und besteht aus 20 homologen Untereinheiten, auch *short consensus repeats* (SCRs) genannt. Der C-terminale Bereich des Faktor H ist wichtig für die Oberflächenbindung des Regulators. Faktor H bindet C3b über die Bindestellen SCRs 1-4, SCRs 8-15 und SCRs 19-20 (Sharma und Pangburn 1996; Jokiranta et al. 1996; Jokiranta et al. 2000). SCRs 19-20 interagieren dabei mit C3b, iC3b und C3d (Jokiranta et al. 2000; Gordon et al. 1995). Die Regionen SCRs 19-20 von Faktor H sind insbesondere für die Unterscheidung zwischen C3b auf komplement-aktivierenden Erregern und C3b auf humanen Zellen verantwortlich (Ferreira et al. 2006). Heparin und weitere Polyanionen werden über die Faktor H-Bindestellen SCR7, SCR20 und SCRs 9-15 gebunden (Jokiranta et al. 2000; Blackmore et al. 1998; Blackmore et al. 1996) (**Abb. 1.3**). Die Erkennung von Polyanionen wie Heparin und Sialinsäuren durch Faktor H ist ebenfalls relevant für die Unterscheidung zwischen Wirtszellen und Erregern, da diese nur auf humanen Zellen vorkommen (Fearon 1978; Pangburn und Müller-Eberhard 1978). Die vier N-terminalen SCRs regulieren die Aktivität des alternativen Weges (Perkins und Goodship 2002; Blackmore et al. 1998). Faktor H fördert durch Kofaktoraktivität für die Serinprotease Faktor I den C3b-Abbau in iC3b. Weiterhin beschleunigt Faktor H den Zerfall der C3-Konvertase des alternativen Weges.

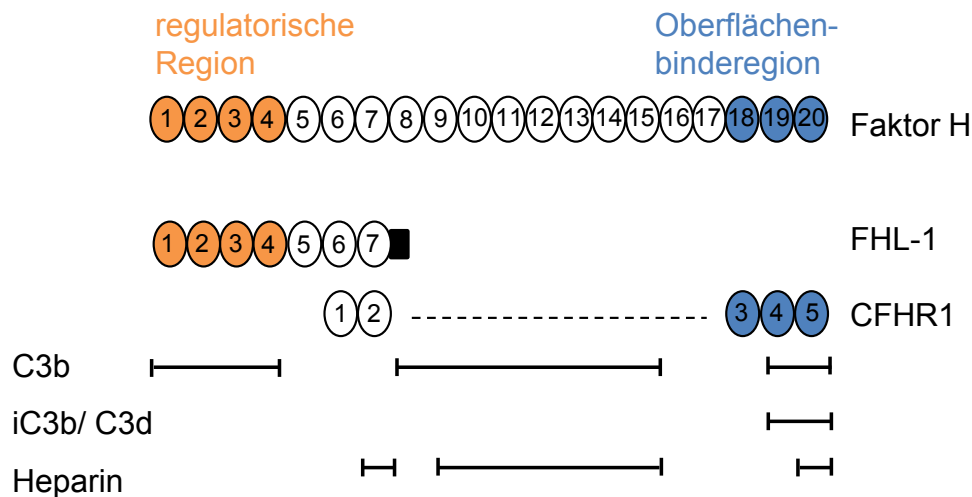


Abbildung 1.3: Der Aufbau von Faktor H und Faktor H-verwandten Proteinen. Der Komplement-regulator Faktor H ist aus 20 SCDs zusammengesetzt. Eine Spleißvariante, FHL-1 genannt, besteht aus den SCDs 1-7 des Faktor H. Die SCDs 1-2 und SCDs 3-5 von CFHR1, einem Faktor H-ähnlichen Protein, weisen hohe Sequenzübereinstimmungen mit Faktor H auf. Während die Proteindomäne für die regulatorische Funktion von Faktor H N-terminal lokalisiert ist, befindet sich die Hauptbindedomäne für humane Proteine im C-terminalen Bereich des Faktor H. So binden C3b und C3b-Spaltprodukte Faktor H überwiegend in den SCDs 19-20. C3b bindet zudem an SCDs 1-4 und SCDs 8-15. Heparin und weitere Sialinsäuren binden Faktor H über SCR 20 sowie SCR7 und SCDs 9-15.

Das *Faktor H*-Gen ist auf Chromosom 1q32 codiert. Das Faktor H-ähnliche Protein 1 (*factor H like*, FHL-1) ist eine Spleißvariante des Faktor H. Es besteht aus den sieben N-terminalen SCDs sowie einem Überhang von vier Aminosäuren. Im gleichen Gencluster liegen die fünf Faktor H-verwandten Proteine (*complement Factor H related*, CFHR): CFHR1 bis CFHR5. Im Plasma liegen CFHRs mit einer Konzentration von 5-100 µg/ml vor. Die CFHRs sind aus vier bis neun, den Faktor H SCDs ähnlichen, Einheiten aufgebaut. CFHRs besitzen, verglichen mit SCDs des Faktor H, Homologien in der Nukleinsäuresequenz. SCR1 von CFHR1 hat beispielsweise eine Sequenzhomologien von 42 % zum SCR6 von Faktor H und die Sequenzen von SCR3 und SCR4 sind nahezu identisch zu den Faktor H- SCDs 18-19 (**Abb. 1.3**).

In einer Vielzahl von Studien wurden bereits Funktionen von CFHRs und von FHL-1 beschrieben. FHL-1 agiert, wie auch Faktor H, als Kofaktor für Faktor I im C3b-Abbau und beschleunigt durch C3b-Bindung den Zerfall der C3-Konvertase des alternativen Weges (Zipfel und Skerka 1999). CFHR1 ist ebenfalls als Komplementregulator beschrieben. Indem CFHR1 C3b der C5-Konvertase bindet, sind die Spaltung von C5 und somit auch die Assemblierung des TCC inhibiert (Heinen et al. 2009). CFHR2 inhibiert Komplement durch Bindung und Inaktivierung der C3-Konvertase (Eberhardt

et al. 2013). CFHR3 und CFHR4 verstärken u. a. die Kofaktoraktivität von Faktor H für die C3b-Spaltung durch Faktor I (Hebecker und Józsi 2012; Hellwage et al. 1999). Für CFHR5 wurde ebenfalls eine schwache Kofaktoraktivität für Faktor I beschrieben (McRae et al. 2005). CFHR5 ist zudem ein Komplementaktivator, der den Abbau menschlicher beschädigter Zellen durch Bindung an diese und an Properdin fördert (Chen et al. 2016).

1.1.4.2 Plasminogen

Plasminogen ist ein Fibrinolyse- und Komplement-regulierendes Glykoprotein, das in der Leber synthetisiert wird. Das Protein besteht aus einem N-terminalen Peptid (8 kDa), fünf *Kringle*-Domänen, die durch Disulfidbrücken verbunden sind und einer Serinprotease-Domäne (Sottrup-Jensen et al. 1975; Castellino und McCance 1997) (**Abb. 1.4**).

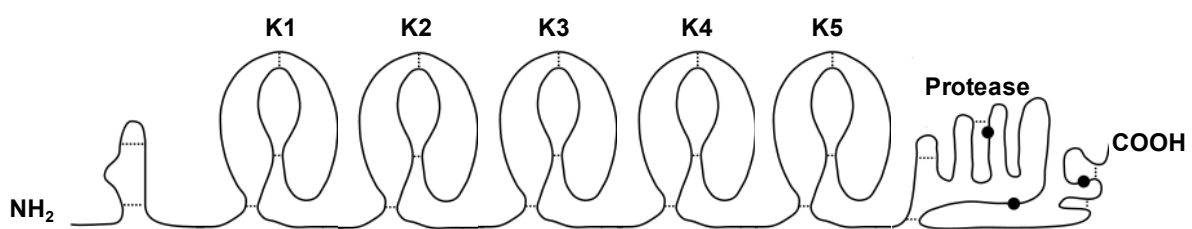


Abbildung 1.4: Der Aufbau des Plasminogens. Plasminogen zirkuliert als inaktives Proenzym und wird zur aktiven Protease Plasmin gespalten. Das Zymogen besteht aus einem N-terminalen Peptid, fünf *Kringle*-Domänen (K1-K5) sowie der C-terminalen Serinprotease-Domäne. Bei Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch humane Aktivatoren werden die Kringle-Domänen von der Protease-Domäne getrennt. Innerhalb der Domänen bestehen Disulfidbrücken (modifiziert nach <https://diapharma.com/plasminogen-plg/>).

Das Proenzym mit einem Molekulargewicht von 92 kDa ist im Plasma in einer Konzentration von 2 μ M vertreten (Miyashita et al. 1988). Mittels Gewebsplasminogenaktivator (*tissue plasminogen activator*, tPa) oder Urokinase-Plasminogen Aktivator (uPa) wird Plasminogen durch Spaltung zur Serinprotease Plasmin aktiviert (Cesarman-Maus und Hajjar 2005). Mikrobielle Proteine, wie Staphylokinase (SAK) und Streptokinase, sind ebenfalls zur Aktivierung von Plasmin befähigt (Bokarewa et al. 2006; Wang et al. 1995). Plasmin ist zudem autokatalytisch. Plasmin(ogen) reguliert die zwei humanen zentralen Kaskadensysteme Komplement und Koagulation, welche eng miteinander verknüpft sind (Peerschke et al. 2008). Plasmin löst Fibringerinnsel auf, reguliert die Fibrinolyse sowie Homöostase und spaltet außerdem extrazelluläre Matrix- (*extracellular matrix*, ECM) Komponenten wie Laminin, Fibrin oder Fibrinogen (Lähteenmäki et al. 2000). Plasmin(ogen) bindet zudem die Komplementproteine C3, C3b, C3d sowie C5 und ist

nach Aktivierung befähigt, diese zu spalten, was dieses Protein zu einem Regulator des Komplements macht (**Abb. 1.2**). Der Abbau von C3b durch Faktor I ist in Anwesenheit von Plasmin(ogen) ebenfalls verstärkt (Barthel et al. 2012a).

1.1.5 Phagozytose durch neutrophile Granulozyten

Neutrophile stellen 50-60 % aller Leukozyten dar. Sie haben eine Halbwertszeit von weniger als sieben Stunden und sind in der Lage, schnell auf eindringende Mikroorganismen zu reagieren (Mayadas et al. 2014). Durch Chemoattraktanten, wie C3a und C5a, werden Neutrophile aus dem Knochenmark zum Ort der Infektion dirigiert (Kolaczowska und Kubes 2013). Die Opsonisierung von Bakterien mit spezifischen Immunglobulinen (Igs) oder Komplementproteinen wie C3b und iC3b ermöglicht eine effiziente Phagozytose durch Neutrophile, welche auf der Oberfläche die notwendigen Fc-Rezeptoren (FcRs) und CRs exprimieren. Neben Albumin sind die Immunglobuline die zweitabundantesten Proteine im humanen Plasma. FcγRII und FcγRIII auf der Oberfläche von Neutrophilen erkennen gebundene IgGs (Peiser 2009). Zur Erkennung der Opsonine des Komplements exprimieren Neutrophile die Rezeptoren CR1 und CR3, während andere Phagozyten, beispielsweise Makrophagen, überwiegend CR3 und CR4 aufweisen (Helmy et al. 2006). CR1 erkennt C3b, C4b und mit geringer Affinität auch iC3b. (Krych-Goldberg und Atkinson 2001). CR3 und CR4 hingegen reagieren auf iC3b (Wright et al. 1987; Ehlers 2000). Nach Aufnahme der Erreger werden diese intrazellulär durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) oder die Ausschüttung von Proteasen und antimikrobiellen Peptiden eliminiert. Wichtig, nicht nur für die Migration zum Ort der Infektion, sondern auch zur Aktivierung von Neutrophilen zur Aufnahme der Pathogenen sowie zur Generierung von ROS und Degranulation sind die Neutrophilen-Rezeptoren C3aR und C5aR für C3a und C5a, CXCR1 für IL-8 sowie TNFR für TNFα (Mollnes et al. 2002). Eine weitere Form der Bekämpfung von Mikroorganismen stellen die 2004 entdeckten *neutrophil extracellular traps* (NETs) dar. Diese bestehen aus DNA, Histonen, antimikrobiellen Peptiden und Proteasen (Berends et al. 2010). Der neutrophile Granulozyt platzt auf, wodurch Chromatin und Granula in den extrazellulären Raum gelangen. Dadurch werden netzartige Strukturen ausgebildet, welche Mikroorganismen umschließen (Brinkmann und Zychlinsky 2012). Mittlerweile ist bekannt, dass Neutrophile durch Sekretion von Zytokinen und ROS auch Einfluss auf die adaptive Immunantwort nehmen (Mayadas et al. 2014).

1.2 *Staphylococcus aureus*

So wie das humane Immunsystem spezifisch gegen eindringende Erreger vorgeht, haben auch die Mikroorganismen evolutiv Strategien entwickelt, die Wirtsabwehr zu umgehen. Diese Mechanismen sind oftmals erregerübergreifend unter Bakterien und Pilzen konserviert.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein grampositives, kugelförmiges Bakterium der Familie der Micrococcaceae. Während gramnegative Bakterien neben einer inneren Membran eine weitere, aus Peptidoglykan und LPS bestehende äußere Membran aufweisen, haben grampositive Bakterien eine äußere Hülle, die aus diversen Schichten von Peptidoglykanen und integrierten Teichonsäuren besteht. *S. aureus* tritt vorwiegend in Traubenform oder paarweise auf, ist Katalase positiv und fakultativ anaerob. Erstmals entdeckt wurde das Bakterium 1880 von dem schottischen Chirurg Alexander Ogston. Mittlerweile sind über 30 Arten bekannt (Harris et al. 2002). Das Genom umfasst ein zirkuläres Chromosom mit Prophagen und Transposons und hat eine Größe von 2,8 Mb. Die mobilen Elemente des Genoms kodieren eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, was *S. aureus* zu einem fakultativ pathogenen Erreger macht. Normalerweise ist *S. aureus* als Kommensale auf der Haut und den Schleimhäuten, vor allem in der Nase und im Rachen zu finden (Peacock et al. 2001). So sind 20 % der Menschen persistent mit *S. aureus* kolonisiert (Kluytmans et al. 1997) und etwa 30-60 % der Bevölkerung transient mit *S. aureus* assoziiert (Foster 2005; Wertheim et al. 2005). Bei Immunsuppression, nach Operationen oder im hohen Lebensalter, kann das Bakterium hingegen eine Vielzahl von Infektionen hervorrufen. Ursächlich dafür ist die regulierte Expression vieler Virulenzfaktoren von *S. aureus* (Foster 2005). Bei oberflächlichen Wunden auf der Haut kann es zu Furunkeln, Karbunkeln und chronischen Wundinfektionen kommen. Weiterhin verursacht *S. aureus* invasive Infektionen wie Osteomyelitis, Endokarditis, Pneumonie, Otitis media und sogar Sepsis. Lebensmittelvergiftungen, das bei Neugeborenen auftretende *staphylococcal scalded skin syndrome* (SSSS) sowie das Toxische Schock Syndrom treten bei Intoxikationen mit *S. aureus* Toxinen auf.

S. aureus ist im Fokus aktueller medizinischer und biologischer Forschung. Aufgrund der schnellen Anpassungsfähigkeit an veränderte Umweltfaktoren ist das Bakterium befähigt, Resistenzen gegen Antibiotika zu entwickeln. Bereits ein Jahr nach

Einführung des ersten Antibiotikums Penicillin G im Jahr 1941 wurden resistente *S. aureus* Stämme identifiziert (Lowy 2003). Im Jahr 1959 wurde ein weiteres Antibiotikum eingeführt, das Methicillin. Schon ein Jahr später konnten Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) Stämme nachgewiesen werden. Die Ausbreitung dieser MRSA Stämme reduziert jedoch die Anzahl effektiver Antibiotika zur Prävention und Behandlung von weit verbreiteten *S. aureus* Infektionen (Gould 2005). Es wird angenommen, dass bis 2006 etwa 53 Millionen Menschen Träger des MRSA waren (Grundmann et al. 2006). Dies verursacht jährlich sehr hohe Kosten für das Gesundheitssystem und birgt ernsthafte Probleme im Gesundheitswesen. So ist *S. aureus* für die meisten im Krankenhaus erworbenen Infektionen verantwortlich (Foster 2004; Fridkin et al. 2005). Trotz derzeit rückgängigem Trend werden weltweit etwa 40 % aller nosokomialen Infektionen durch *S. aureus* hervorgerufen (Smyth et al. 2012; Wertheim et al. 2004).

Da die Behandlung einer *S. aureus* Infektion mit Antibiotika risikobehaftet ist, ist ein Forschungsschwerpunkt die Wirt-Pathogen-Interaktion. Neue Erkenntnisse zu den Mechanismen der Virulenzproteine stellen ein vielversprechendes Mittel zur Entwicklung neuer Therapeutika dar.

1.2.1 Virulenz von *S. aureus*

Staphylokokken besiedeln den Körper mit dem Ziel, zu proliferieren, Nährstoffe zu gewinnen und sich zu vermehren. Um dies zu realisieren haben sich evolutiv Virulenzfaktoren gebildet, die *S. aureus* vor dem Immunsystem des Wirts schützen.

1.2.1.1 Regulation der Genexpression von Virulenzfaktoren

Gene, die für Virulenzproteine kodieren sind auf dem Chromosom sowie extra-chromosomal lokalisiert (Peacock et al. 2001). Das erste beschriebene Immunevasions-Cluster wurde auf der Pathogenitätsinsel SaPI5 beschrieben (Rooijakkers et al. 2005a). Die Expression von Virulenzproteinen in *S. aureus* wird durch ein komplexes Netzwerk von Regulatoren kontrolliert. Dazu gehören unter anderem die Zweikomponentensysteme Agr (*accessory gene regulator*) und SaeRS (*S. aureus* exoprotein expression) sowie der Transkriptionsfaktor Rot (*repressor of toxins*):

Die Aktivierung des Agr ist zelldichteabhängig. Das Agr-P2 Transkript kodiert für AgrC, einen Signalrezeptor, sowie AgrA, den *response* Regulator. AgrB und AgrD

werden ebenfalls exprimiert und sekretieren aktivierende Liganden für den Signalrezeptor AgrA, sogenannte *auto inducer* Peptide (AIP) (Novick und Geisinger 2008). Das Agr P3-Transkript kodiert hingegen für die regulatorische RNAIII. Diese reguliert die Stimulation der Agr-kontrollierten Gene entweder direkt oder indirekt durch dessen *antisense*-Funktion. Die indirekte Regulation wird durch die posttranskriptionelle Repression der RNA III durch den Transkriptionsfaktor Rot realisiert (Geisinger et al. 2009). Die Agr-Aktivierung induziert die Produktion sekretierter Zytotoxine, Superantigene, Enzyme und weitere Virulenzfaktoren (Queck et al. 2008; Dunman et al. 2001).

Rot ist ein Transkriptionsfaktor. Auf der einen Seite reprimiert Rot die Aktivierung der Gene für sekretierte Proteine wie hämolytische Toxine, Enterotoxine und Enzyme (Saïd-Salim et al. 2003; Tseng und Stewart 2005; McNamara et al. 2000), die Funktionen in der Verbreitung der Mikroorganismen oder der Beschaffung von Nährstoffen inne haben. Auf der anderen Seite aktiviert Rot Gene, welche für Oberflächenproteine kodieren, wie beispielsweise Protein A (*spa*) und *clumping factor B* (*ClfB*) (Cheung et al. 2001; Saïd-Salim et al. 2003). Diese Genprodukte sind potentiell in der Ausbildung von Infektionen durch Bakterien, vor allem in frühen Stadien involviert.

Sae (*S. aureus* exoprotein expression) ist ein Zweikomponentensystem, welches ebenfalls die Expression von Virulenzfaktoren von *S. aureus* reguliert (Giraud et al. 1994). SaeR stellt den *response* Regulator dar, SaeS ist die Sensor Kinase. Der Sae Genlokus weist zwei Promotoren auf: P1 ist unter negativer Kontrolle durch den Sigmafaktor B (SigB) sowie Rot und ist positiv autoreguliert. Die Anwesenheit von Neutrophilen bedingt beispielsweise die Aktivierung von P1. Der zweite Promotor, P3, weist konstitutive Aktivität auf (Geiger et al. 2008). Die Gene mit einem P3 Promotor kodieren für die Sae Komponenten SaeR, SaeS und SaeQ. SaeRS ist mit der Pathogenität von *S. aureus* assoziiert, beispielsweise in Tiermodellen (Montgomery et al. 2010; Nygaard et al. 2010) und bei der Umgehung des Abtötens von Staphylokokken durch Neutrophile (Voyich et al. 2009).

1.2.1.2 Virulenzmechanismen von *S. aureus*

Virulenzproteine sind vielfältiger Natur. Ein erster mechanischer Schutz ist die Ausbildung einer Kapsel. So ist insbesondere bei *S. aureus* des Serotypes 5 und 8 eine Polysaccharidkapsel innerhalb der klinischen Isolate sehr verbreitet (Watts et al.

2005). Generell sind Virulenzproteine in Adhäsine, Invasine, Immunevasine sowie Toxine unterteilt (Henderson 2014). Während im Folgenden generell auf Adhäsine, Invasine und Toxine eingegangen wird, beschreibt das Kapitel 1.2.1.3 detailliert die Komplementevasionsmechanismen von *S. aureus*. Die Phagozytose von *S. aureus* durch Neutrophile sowie Evasionsmechanismen vor der Phagozytose durch Neutrophile sind in Kapitel 1.2.1.4 dargestellt.

S. aureus ist als Kommensale auf den Schleimhäuten des Menschen zu finden. Im Falle einer Infektion bei Immunsuppression werden zudem Fremdmaterialien wie Katheter und Plastikimplantate besiedelt. Um zu adhären exprimiert *S. aureus* auf der Oberfläche mikrobielle Oberflächenkomponenten, die adhäsive ECM-Moleküle erkennen (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*, MSCRAMMs). MSCRAMMs sind zumeist an der Zelladhäsion und -invasion beteiligt. Bereits charakterisierte Beispiele sind ClfA und ClfB, die Fibrinogen-bindenden Proteine A und B (FnbpA und FnbpB) und Spa, welche humane Proteine der ECM, wie Kollagen, Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin und Elastin binden (Foster 1998; Clarke und Foster 2006). *S. aureus* bindet somit Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen etc. und kann folglich vom Immunsystem nicht als körperfremd erkannt werden. Zur Invasion in die Gewebe dienen Enzyme wie Hyaluronidasen, Lipasen, Kollagenasen und Nukleasen sowie zytolytische Toxine, z. B. das α -Toxin. Ein weiteres *S. aureus* Toxin ist das extrazelluläre *toxic shock syndrome toxin 1* (TSST1), welches ein Superantigen darstellt. Die Enterotoxine A bis E verursachen Lebensmittelvergiftungen (Prescott 1998) und die Exfoliatintoxine A und B das SSSS, eine nicht entzündliche, blasenförmige Ablösung der Haut bei Babys (**Abb. 1.5**).

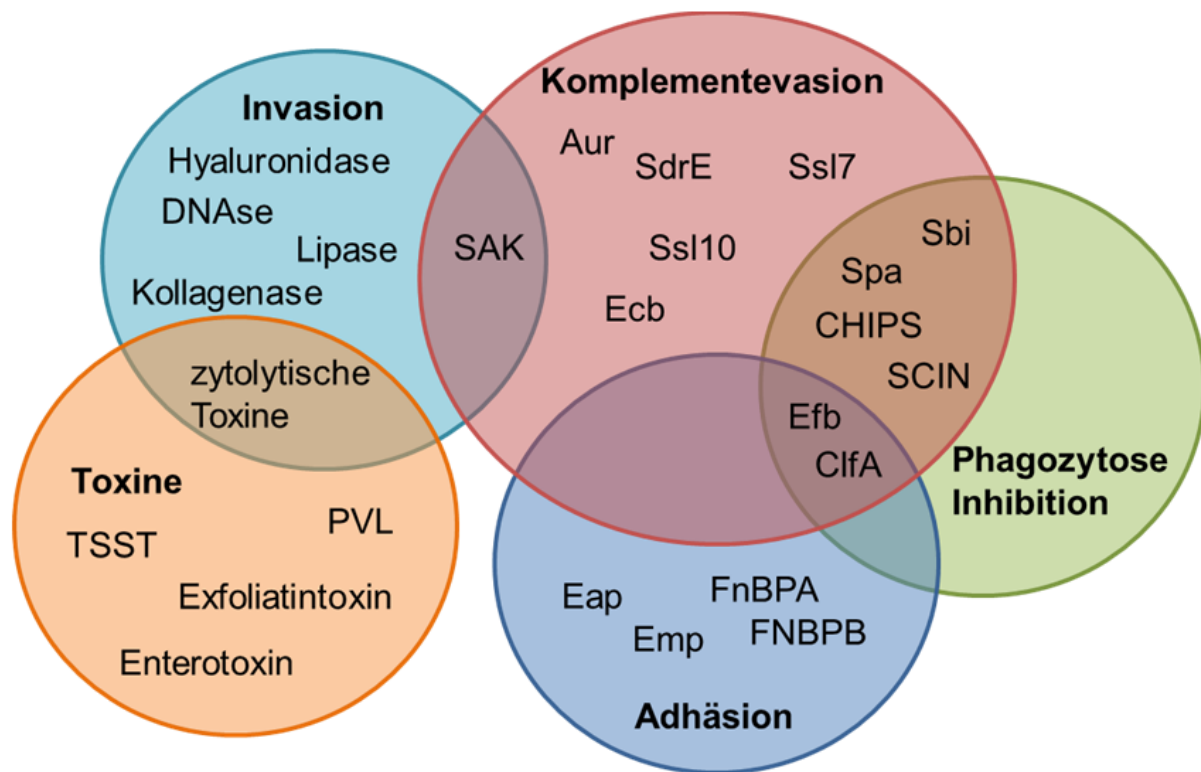


Abbildung 1.5: Übersicht über Virulenzproteine von *S. aureus*. Um der Immunantwort des humanen Wirts zu entgehen, exprimiert *S. aureus* eine Vielzahl von Virulenzfaktoren. Diese werden unterteilt in Komplementevasionsproteine, Phagozytoseinhibitoren, Adhäsine, Invasine sowie Toxine. Da die Abwehr des menschlichen Immunsystems ein komplexes und konzertiertes Zusammenspiel der Virulenzfaktoren erfordert, werden viele Proteine in mehr als nur eine Gruppe klassifiziert. So sind beispielsweise für Efb und ClfA Funktionen in der Inhibition des Komplements und der Phagozytose sowie als Adhäsine beschrieben. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

1.2.1.3 *S. aureus* und Komplementevasion

Die Komplementevasion von *S. aureus* wird durch drei Mechanismen realisiert: i) Proteine, welche direkt Einfluss auf die Komplementaktivierung nehmen; ii) Proteine, die Regulatoren des Komplements binden und rekrutieren und iii) komplement-spezifische mikrobielle Proteasen, die Proteine der Kaskade zersetzen.

i) *Extracellular fibrinogen binding protein* (Efb) und dessen Homolog *extracellular complement binding protein* (Ecb) binden das Komplementprotein C3d und wirken inhibitorisch auf C3- und C5-Konvertasen. Efb verhindert, dass Faktor B an C3b bindet (Haspel et al. 2008; Jongerius et al. 2007). Der C-terminale Teil des *Staphylococcus aureus binder of IgG* (Sbi), Sbi3-4, ist strukturell ähnlich der C3-Bindedomäne des Efb. Sbi3-4 beinhaltet ein Drei-Helix-Bündel-Motiv (*three-helix bundle motif*) (Hammel et al. 2007; Upadhyay et al. 2008) und bindet ebenfalls C3 (Haupt et al. 2008; Burman et al. 2008). *Staphyococcal complement inhibitor* (SCIN) bindet an aktive C3-Konvertasen auf bakteriellen Oberflächen und inaktiviert diese

darüber. Dadurch wird die Opsonisierung und daraus folgende Phagozytose inhibiert (Roosjakkers et al. 2005a). Die Initiation der Komplementaktivierung, vor allem des klassischen Weges, kann ebenfalls durch mikrobielle Proteine beeinflusst werden. Spa sowie Sbi binden das Immunglobulin IgG am konstanten Teil (Fc-Teil) und inhibieren somit die Erkennung durch die Initiator-moleküle des klassischen Weges (Zhang et al. 1998). Ssl7 und Ssl10 binden IgA sowie IgG (Langley et al. 2005; Itoh et al. 2010) und blockieren ebenfalls die Komplementaktivierung über den klassischen Weg. Ssl7 bindet zudem an C5, was die Spaltung des C5 und dadurch bedingt die Ausbildung des TCC inhibiert.

ii) Viele Komplementregulatoren werden durch sezernierte oder oberflächen-assoziierte *S. aureus* Proteine gebunden. Das Protein ClfA rekrutiert die Protease Faktor I und steigert somit die Faktor I-induzierte Spaltung von C3b in iC3b (Hair et al. 2008).

S. aureus bindet weiterhin Faktor H sowie FHL-1 und andere Faktor H-verwandte Proteine (Sharp et al. 2012). Durch *S. aureus* gebundener Faktor H inhibiert den alternativen Komplementweg durch Abbau der C3-Konvertase, wodurch folglich weniger C3 gespalten wird. *S. aureus*-gebundener Faktor H erhält zudem seine Kofaktor-Aktivität für Faktor I (Sharp et al. 2012). Bisher bekannte Faktor H-bindende Staphylokokken-Proteine sind Sbi, Efb (Böhm 2013) und *Serine aspartate repeat protein* E (SdrE), wobei Sbi und Efb mit Faktor H und C3 bzw. C3b einen Tripartit-Komplex bilden. Das Protein Ecb bindet Faktor H indirekt über eine Tripartit-Komplex-Ausbildung mit C3b (Amdahl et al. 2013). Sbi rekrutiert C3 und blockiert den alternativen Komplementweg zum einen durch die Initiierung des Verbrauchs von C3 (Clark et al. 2011; Burman et al. 2008). Zum anderen werden im Tripartit-Komplex mit Faktor H sowohl C3 (Hammel et al. 2007) als auch C3b (Haupt et al. 2008) durch Faktor I gespalten, was eine Inhibition der Komplementkaskade verursacht.

Ein weiterer Regulator, der durch *S. aureus* rekrutiert wird, ist Plasminogen. *S. aureus* gebundenes Plasminogen kann durch die mikrobielle Protease SAK gespalten und in Plasmin aktiviert werden (Mölkänen et al. 2002; Lähteenmäki et al. 2001; Okada et al. 2000). Die folgenden *S. aureus* Proteine binden Plasminogen: die zytosolischen Proteine Inosin 5' Monophosphat Dehydrogenase (IMPDH), α -Enolase, Ribonukleotid-Reduktase (Mölkänen et al. 2002; Antikainen et al. 2007), die

Sortase-verankerten zellwandassoziierten FnBPA und FnBPB (Pietrocola et al. 2016), das Mangan-Transport Protein C (MntC) (Salazar et al. 2014) sowie die extrazellulären und membranassoziierten Proteine Efb und Sbi. Plasmin(ogen) spaltet neben ECM-Proteinen Opsonine, wie IgG und C3b und inhibiert damit die Komplementkaskade. *S. aureus* umgibt sich mit einem Fibrinwall, um der Erkennung durch das humane Immunsystem zu entgehen. Zur weiteren Ausbreitung des Erregers *S. aureus* nach Vermehrung dient die Plasminogenrekrutierung der Auflösung dieser Fibringerinnsel (Barthel et al. 2012a).

iii) Dadurch, dass SAK das Proenzym Plasminogen in Plasmin aktiviert, verstärkt die SAK die Freisetzung von *S. aureus* aus Fibringerinnseln durch deren Auflösung und kann somit zur Ausbildung einer systemischen Infektion beitragen (Lähteenmäki et al. 2005; Lähteenmäki et al. 2001; Mölkänen et al. 2002). Mit Hilfe der Protease Aureolysin (Aur) kann zudem der humane Aktivator des Plasminogens, das uPa aus dem Pro-uPa aktiviert werden (Beaufort et al. 2008) (**Abb. 1.5**).

1.2.1.3.1 *S. aureus* und der TCC

S. aureus ist, genau wie alle grampositiven Bakterien, durch eine dicke Peptidoglykanschicht vor der Lyse durch den TCC geschützt ist. Dennoch gibt es Virulenzproteine, welche die TCC-Assemblierung inhibieren. Das *S. aureus* Protein Ssl7 blockiert beispielsweise die Freisetzung von C5a und dem für den TCC wichtigen C5b, indem es C5 bindet und die Bindung dessen an die C5-Konvertase unterbindet (Bestebroer et al. 2010). Und obwohl keine Lyse möglich ist, sind monomere und polymere C9-Proteine auf der Zelloberfläche vorhanden. Dies deutet auf eine weitere, bisher unbekannte Rolle des TCC hin (Berends et al. 2013). In zwei Studien wurde bereits über eine mögliche neue Rolle des TCC berichtet: lösliche C5b-9-Komplexe üben durch Bindung an Endothelzellen einen proinflammatorischen Effekt aus (Tedesco et al. 1997). Weiterhin tragen lösliche C5b-9-Komplexe zur Neutrophilen-Chemotaxis bei (Dobrina 2002).

1.2.1.4 Phagozytose von *S. aureus* durch Neutrophile und Evasionsmechanismen

Neutrophile sind die einzigen humanen phagozytischen Zellen, welche Staphylokokken effektiv durch Aufnahme und Bekämpfung mit Proteasen, antimikrobiellen Peptiden und Proteinen sowie ROS-Generierung abtöten können

(van Kessel et al. 2014). Voraussetzung für die Phagozytose ist die Erkennung von *S. aureus* als körperfremd. Charakteristische Phagozytosemarker von *S. aureus* sind Zellwandkomponenten, wie Peptidoglykan (PGL), Zellwand Teichonsäuren (*wall teichoic acids*, WTA) und Proteine wie ClfA (Brown et al. 2013; Silhavy et al. 2010). Die Erkennung von PGL durch IgG und auch durch das aktive Komplementprotein C3b spielt eine zentrale Rolle (Peterson et al. 1978). Da *S. aureus* ein Kommensale ist, besitzen auch gesunde Menschen im Serum Antikörper gegen das fakultativ pathogene Bakterium. Diese machen 0,1-3 % aller Serum-Antikörper aus. Die bei der Aktivierung des Komplements freigesetzten Moleküle C3b und iC3b sowie die bereits genannten Immunglobuline binden an die Zellwandstrukturen von *S. aureus* und opsonisieren den Erreger somit.

Neben den bereits erwähnten NETs, die etwa 3-4 Stunden nach Exposition mit Staphylokokken auf diese reagieren, entdeckten Pilsczek et al. 2010 das Vorhandensein von extrazellulären Vesikeln von Neutrophilen als Antwort auf eindringende Staphylokokken. Nach bereits 5-60 Minuten werden Vesikel, gefüllt mit nukleärer DNA in den extrazellulären Raum freigegeben. Dort brechen die Vesikel auf. Chromatin wird freigesetzt und tötet eingedrungene *S. aureus* ab. Die Neutrophilen untergehen in diesem Zusammenhang keiner Lyse und die Plasmamembran bleibt komplett erhalten (Pilsczek et al. 2010).

Viele *S. aureus* Virulenzfaktoren richten sich gegen die angeborene Immunantwort, phagozytische Zellen eingeschlossen. Bis zu 50 % aller klinischen *S. aureus* Stämme besitzen eine Polysaccharidkapsel (O’Riordan und Lee 2004), welche die Phagozytose inhibiert (Nanra et al. 2013; Thakker et al. 1998). *S. aureus* entgeht zudem der Erkennung durch phagozytische Zellen durch die Sekretion von IgG-bindenden Proteinen. Spa hat fünf Ig-bindende Domänen, mit denen es den Fc-Teil von Antikörpern bindet und diese somit für die Detektion unzugänglich macht (Dossett et al. 1969; Peterson et al. 1977). Ein weiteres Protein, Sbi, besitzt zwei Ig-bindende Domänen mit ähnlicher Spezifität wie für Spa (Atkins et al. 2008). Sbi *knock out* Bakterien weisen, verglichen mit dem Wildtyp, ein schlechteres Überleben auf und werden schneller durch Neutrophile aufgenommen (Smith et al. 2011). Die Erkennung der Opsonine des Komplementsystems wird durch vielfältige Mechanismen mittels *S. aureus* Proteinen unterbunden. Efb bindet an das Opsonin C3b und zugleich an Fibrinogen und verdeckt C3b sowie gebundene Igs unter einer

Fibrinogenschicht (Ko et al. 2013). ClfA inhibiert die Phagozytose ebenfalls durch Bindung des humanen Fibrinogens (Higgins et al. 2006). Mikrobiell gebundenes Plasmin(ogen) trägt ebenfalls zur aktiven Beseitigung der Opsonine bei: einerseits binden Sbi und Efb Plasmin(ogen) und dieses spaltet C3b (Koch et al. 2012) und andererseits aktiviert die mikrobielle SAK humanes Plasminogen zu Plasmin, welches C3b und IgG spaltet (Rooijackers et al. 2005b). Das *S. aureus* Protein *chemotaxis inhibitory protein of staphylococci* (CHIPS) inhibiert die Chemotaxis von Neutrophilen und Monozyten. CHIPS bindet direkt an C5a und an Formyl-Peptid Rezeptoren und inhibiert somit die Rekrutierung von Phagozyten (de Haas et al. 2004; Postma et al. 2004) (**Abb. 1.5**).

15-50 % der phagozytierten *S. aureus* überleben zudem auch nach der Internalisierung durch Neutrophile (Kobayashi et al. 2010; Rogers und Tompsett 1952; Voyich et al. 2005). Leukozidine werden im Inneren freigesetzt und lysieren die Neutrophilen osmotisch (DuMont et al. 2013; Panton und Valentine 1932), außerdem können die gebildeten ROS mittels Katalasen und Superoxiddismutasen neutralisiert werden (Mandell 1975). Um den NETs zu entkommen, exprimieren Staphylokokken Nukleasen (Berends et al. 2010).

1.2.2 Superantigene und Superantigen-ähnliche Proteine (SsIs)

S. aureus exprimiert 40 sekretierte Toxine, die als bakterielle Superantigene bezeichnet werden. Superantigene verbinden sogenannte Haupt-Histokompatibilitätskomplex- (*major histocompatibility complex*, MHC) Klasse 2-Komplexe auf Antigen-präsentierenden Zellen mit T-Zell-Rezeptoren und stimulieren damit sehr potent T-Zellen. Die Gene der Superantigene sind durch genetische Elemente, wie Transposons, Plasmide und Pathogenitätsinseln oder auch durch Prophagen kodiert. Die Ausschüttung dieser Toxine in die humane Blutbahn verursacht daher die Freisetzung von großen Mengen an Zytokinen wie IL-2, IFN- γ und TNF- α . Eine systemische Intoxikation mit einem Toxin, wie dem TSST von *S. aureus*, kann schnell zu einer lebensbedrohlichen Situation führen (Fraser und Proft 2008).

Superantigen-ähnliche Proteine (*secreted superantigen like*, ssl) von *S. aureus* sind evolutionär aus Superantigenen entstanden (Chung et al. 2007). Insgesamt gibt es 14 SsIs. Die Gene *ss1-ss10* sind in der Pathogenitätsinsel SaPI_{n2} kodiert, *ss11* ist nah am Hauptcluster kodiert und *ss12-ss14* befinden sich in einem zusätzlichen Cluster stromabwärts vom ssl-Hauptcluster (Fraser und Proft 2008). Die

Pathogenitätsinsel saPI_n2 ist möglicherweise essentiell an der evolutiven Entwicklung von *S. aureus* zum humanen Krankheitserreger beteiligt (Baba et al. 2008). Unter Normalbedingungen werden Ssls nur in geringem Maß exprimiert. Unter spezifischen Stressbedingungen wird die Expression jedoch stark hochreguliert. Die Funktionen der Ssls unterscheiden sich von den Superantigenen. Ssls stellen Inhibitoren der angeborenen Immunität dar (Fraser und Proft 2008).

Ssls sind Superantigenen strukturell ähnlich, da sie aus den gleichen zwei Polypeptid-Domänen zusammengesetzt sind. N-terminal befindet sich eine Oligosaccharid-Bindedomäne (OB) und C-terminal eine sogenannte β -grasp-Domäne (Arcus et al. 2002; Langley et al. 2010; Fraser und Proft 2008). Die OB-Domäne besteht aus einer fünf-strängigen β -Faltblattstruktur, die sich zu einem β -barrel formiert und von einer kleinen α -Helixstruktur verschlossen wird (Fraser und Proft 2008). Die β -grasp-Domäne ist eine gewundene β -Faltblattstruktur aus vier bis fünf antiparallelen Strängen die an eine hochkonservierte α -Helix angrenzt (Fraser und Proft 2008). Die Strukturen von Ssl7 (Al-Shangiti et al. 2004), Ssl5 (Arcus et al. 2002) sowie Ssl11 (Chung et al. 2007) wurden bereits näher charakterisiert. Obwohl deren generelle Struktur der des TSST-Superantigens sehr ähnelt, weisen die für die MHC Klasse II-Bindung verantwortlichen Domänen erwartungsgemäß bei den Ssls eine andere Struktur auf (**Abb. 1.6**).

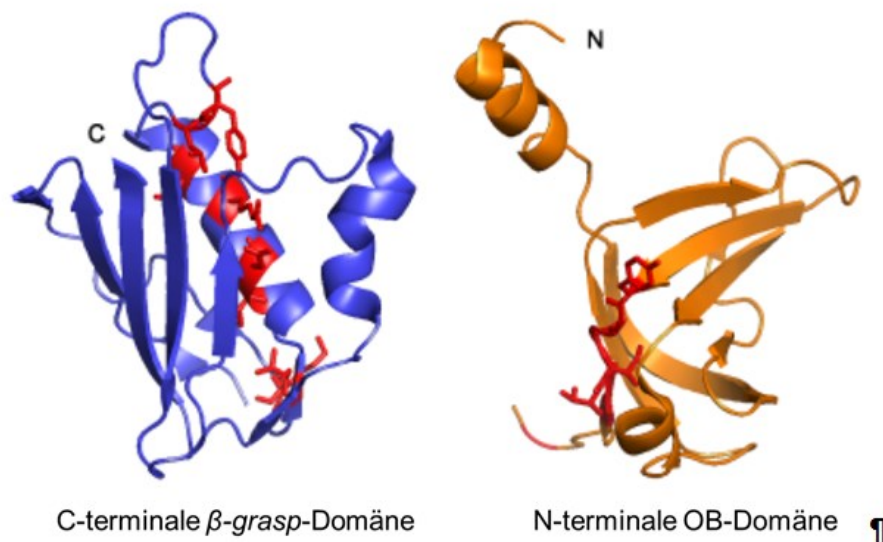


Abbildung 1.6: Der Aufbau von Superantigenen und Ssls. Superantigene und Ssls bestehen jeweils aus einer N-terminalen OB-Domäne und einer β -grasp-Domäne, die C-terminal lokalisiert ist. Die OB-Domäne umfasst fünf β -Faltblattstrukturen und eine α -Helix. Die β -grasp-Domäne weist eine gewundene β -Faltblattstruktur aus antiparallelen Strängen auf und grenzt an eine hochkonservierte α -Helix (modifiziert nach Fraser und Proft 2008).

1.2.2.1 Regulation der Expression von Ssls

Die Expression von Ssls wird generell durch das Quorum sensing system Agr reguliert. Die Repression der *ss/* Expression erfolgt indirekt und Agr-abhängig. Der Transkriptionsfaktor Rot sowie das Zweikomponentensystem SaeRS beeinflussen die Aktivierung von *ss/*-Genen positiv und in konzertierter Weise. *S. aureus* Stämme, die kein Agr besitzen, exprimieren verstärkt Ssls. Rot war ursprünglich als Repressor für Virulenzfaktoren bekannt (McNamara et al. 2000), induziert aber auch die Expression von Spa (Tegmark et al. 2000). Es wurde erstmals beschrieben, dass Rot und SaeR in konzertierter Weise an *ss/* Promotoren binden und somit die Expression von Ssls bewirken (Benson et al. 2012). Rot und SaeR interagieren direkt mit den *ss/* Promotoren und aktivieren diese somit, insbesondere das Ssl11. Die Bindestelle von SaeR an bakterielle Promotoren wurde bereits identifiziert (Nygaard et al. 2010). Zudem weisen die Promotoren der *ss/s* eine SaeR Bindestelle auf, welche jeweils mit der -35 Region überlappt (Benson et al. 2011). Das Agr-System wiederum verhindert die Expression von Ssls, indem Rot durch RNA III inhibiert wird (Benson et al. 2011).

1.2.2.2 Ssls sind Virulenzproteine

Ssls sind virulenzassoziierte Proteine. Genau wie viele Superantigene sind auch die Ssls oftmals befähigt, zwei Targetproteine zu binden. Viele Funktionen von Ssls wurden bereits identifiziert: So bindet Ssl3 TLR2 und inhibiert dessen Aktivierung auf der Oberfläche von humanen und murinen Neutrophilen und Monozyten (Bardoel et al. 2012).

Ssl4 und Ssl11 binden glykanabhängig an myeloide Zellen und werden von Neutrophilen und Makrophagen effektiv internalisiert (Hermans et al. 2012). Ssl2-Ssl6 und Ssl11 haben in der C-terminalen Domäne eine hochkonservierte Sialyllaktosamin-Bindestelle (Baker et al. 2007). Die Affinität von Ssl4 zur Sialinsäure Sialyl Lewis X (Sle^x) ist dabei viel höher als diejenige von Ssl11. Ssl11 bindet wiederum stärker an die verkürzte Variante von Sle^x namens Sialyllactosamin (sLacNac) (Hermans et al. 2012). sLacNac ist ein Trisaccharid und wird auf Oberflächen-Glykoproteinen, wie P-Selektin Glykoprotein (PSGL-1), exprimiert. Ssl4 und Ssl11 kompetitieren dabei nicht um die Bindung an Zellen (Hermans et al. 2012).

Ssl5 nimmt Einfluss auf neutrophile Granulozyten (Baker et al. 2007), indem es die Adhärenz der Neutrophilen an P-Selektin beinhaltende Oberflächen potent inhibiert

(Bestebroer et al. 2007; Arcus et al. 2002). Ssl5 ist damit ein Inhibitor der Leukozyten-Rekrutierung.

Ssl7 bindet IgA (Langley et al. 2005) und unterbindet die Komplementaktivierung über den klassischen Weg. Damit verhindert Ssl7 die Erkennung durch den Fc α R1 (Langley et al. 2005; Ramsland et al. 2007). Ssl7 inhibiert weiterhin als Antwort auf *S. aureus* die Generierung von ROS durch Phagozyten (Bestebroer et al. 2010). Ssl7 bindet zudem C5 mittels der C-terminalen β -grasp-Domäne, während die OB-Domäne IgA bindet (Laursen et al. 2010). Der Effekt dieser Ssl7-C5-Bindung wird in der Inhibition der durch Komplement verursachten Lyse, sowohl von *E. coli*, als auch Hämolyse von Erythrozyten deutlich (Langley et al. 2005). Es ist wahrscheinlich, dass die Lyse verhindert wird, weil die Spaltung von C5 inhibiert und der TCC nicht generiert wird (Bestebroer et al. 2010).

Ssl10 bindet, ähnlich wie Protein A, humanes IgG und blockiert die Bindung an Fc γ R auf Monozyten (Itoh et al. 2010). Durch Ssl10 wird die Phagozytose von IgG1-opsonisierten *S. aureus* durch Neutrophile inhibiert (Patel et al. 2010). Ssl10 bindet weiterhin Fibrinogen und Fibronectin via der C-terminalen β -grasp-Domäne (Patel et al. 2010) und beeinflusst die Adhäsion und Invasion von *S. aureus* positiv.

1.2.2.3 Ssl11

Ssl11 hat ein Molekulargewicht von 25 kDa und wird von allen bisher untersuchten *S. aureus* Stämmen exprimiert (Chung et al. 2007). Die N-terminale OB-Domäne von Ssl11 besteht aus den Aminosäuren 22-89. Die fünfsträngige β -grasp-Domäne setzt sich aus den fünf β -Faltblatt-Strukturen β 1 bis β 5 zusammen. Über einen flexiblen Linker ist die OB-Domäne mit der C-terminalen β -grasp-Domäne, von Aminosäure 98 bis 196, verbunden, bestehend aus der α -Helix α 4 und den fünf β -Faltblättern β 7- β 6- β 12- β 9- β 10. Die N-terminalen Aminosäuren 8-18 bilden eine Helix, welche innerhalb der Lücke zwischen beiden Domänen lokalisiert ist (Chung et al. 2007) (**Abb. 1.8**).

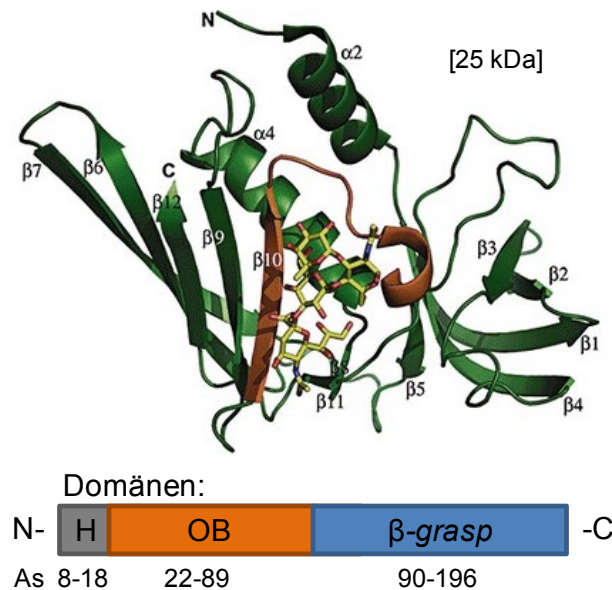


Abbildung 1.7: Ssl11 besteht aus einer OB- und einer β-grasp-Domäne. Das *S. aureus* Protein Ssl11 besteht aus einer N-terminal lokalisierten OB-Domäne. Ein Linker in Form einer α-Helix verbindet diese mit der C-terminalen β-grasp-Domäne. Ssl11 hat ein Molekulargewicht von 25 kDa. Die Struktur von Ssl11 (grün) in Komplex mit der Sialinsäure Sle^x (orange) wurde bereits im Detail charakterisiert (modifiziert nach Chung et al. 2007).

Mit 44 % Sequenzidentität ist Ssl11 dem Ssl5 strukturell am ähnlichsten (Chung et al. 2007). So sind die Faltblattstrukturen β6 und β7 länger als bei anderen Ssls. Daraus bildet sich eine Haarnadel-Struktur, die eine Dimerisierung dieser beiden Proteine ermöglicht. Zudem fehlen Ssl5 und Ssl11 hinter der Faltblattstruktur β10 neun bis zehn Aminosäuren. Die daraus entstandene V-förmige Struktur stellt eine Bindestelle für die Sialinsäure Sle^x dar.

Sialinsäuren sind ein geeignetes Target für Mikroorganismen für die Wirtserkennung, Anlagerung und Invasion (Bishop und Gagneux 2007). Sle^x ist ein Ligand für P-, E- und L-Selektin (Somers et al. 2000) und ist essentiell für die Rekrutierung von Leukozyten. Ssl11 bindet an Glykoproteine, die Sialinsäuren beinhalten, wie beispielsweise den Fc-Rezeptor für IgA (FcαRI) und PSGL-1. PSGL-1 stellt einen Liganden für P-Selektin dar, welches wiederum die Adhärenz von Neutrophilen an Endothelzellen reguliert. Dadurch wird die Anlagerung von Neutrophilen an P-Selektin-tragende Oberflächen blockiert.

Verantwortlich für die Bindung von Ssl11 an Sialinsäuren sowie Galaktose-Reste sind Bindestellen innerhalb der C-terminalen β-grasp-Domäne. Ssl11 blockiert somit potent die Adhärenz von Neutrophilen an Endothelzellen und trägt zudem zur schnellen Internalisierung in Neutrophile bei (Chung et al. 2007).

1.2.3 PurA - ein *moonlighting* Protein von *S. aureus*

Das Protein Adenylsuccinat Synthetase (PurA) wurde bisher als zytosolisches Enzym mit einem Molekulargewicht von 47 kDa beschrieben. Im Nukleinsäure-Stoffwechsel katalysiert PurA in Anwesenheit von Magnesium die Reaktion vom Inosinmonophosphat (IMP) und Guanosintriphosphat (GTP) und Aspartat zum Adenylsuccinat (Silva et al. 1995).



Die Adenylsuccinat-Synthetase wird dabei durch AMP, Adenylsuccinat, GDP und GMP feedback-inhibiert. Dies wird durch signifikante Konformationsänderungen innerhalb der Synthetase ermöglicht, die durch Nukleotid-Liganden hervorgerufen werden (Silva et al. 1995).

Das Gen für PurA ist gemeinsam mit weiteren *pur*-Genen in einem Operon kodiert. Diese Gene kodieren ebenfalls für Purin-Synthese-Enzyme. Das exprimierte Protein liegt als Dimer vor. Verglichen mit den Synthetasen anderer Bakterienstämme besteht eine Aminosäure-Sequenz-Homologie von etwa 40 % (Silva et al. 1995).

PurA hat einen Einfluss auf die Virulenz von *S. aureus* (Lawrence et al. 1997; Selle 2015). Damit ist PurA ein neu identifiziertes *moonlighting* Protein. *Moonlighting* Proteine sind zytosolische Metabolismus-Proteine, welche zudem sekretiert oder oberflächenassoziiert vorkommen und zumeist eine Funktion in der Virulenz aufzeigen. Die meisten humanpathogenen Mikroorganismen besitzen *moonlighting* Proteine als Virulenzfaktoren. Das erste identifizierte *moonlighting* Protein war zu Beginn der 1990er Jahre die Glyzerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase (GAPDH) von *Streptococcus pyogenes*, welche auf der mikrobiellen Oberfläche lokalisiert ist. Viele *moonlighting* Proteine sind evolutionär früh entstanden und haben eine ausgeprägte Konservierung der Gensequenz zwischen Pro- und Eukaryoten. Bakterielle *moonlighting* Proteine können eine einzelne *moonlighting*-Funktion haben oder viele zusätzliche biologische Funktionen ausüben. Sie wirken als Adhäsine oder Signalmoleküle (Henderson 2014).

1.3 Ziel des Promotionsprojektes

Staphylokokken nutzen hochentwickelte Strategien, um das humane Komplementsystem zu umgehen und so die Wirtsantwort zu manipulieren. Es wurden bereits viele komplementinhibierende Proteine von *S. aureus* identifiziert und hinsichtlich ihres spezifischen Wirkmechanismus charakterisiert. Neben Proteinen mit einzigartigen Funktionen weisen viele Proteine auch redundante Funktionen auf. Aufgrund der Zunahme der Multiresistenzen birgt die Behandlung von *S. aureus* Infektionen mit Antibiotika immer Risiken. Um eine neuartige Therapieform zu entwickeln, ist es einerseits essentiell, die Wirkmechanismen von komplementinhibitorisch wirkenden Staphylokokken Proteinen zu verstehen. Andererseits ist es von elementarer Bedeutung, wenngleich auch um einiges schwieriger, das komplexe Zusammenspiel dieser einzigartig und redundant wirkenden Proteine zu ergründen. Die Basis dessen besteht jedoch zunächst in der Identifizierung bisher unbekannter Komplementinhibitoren und der Charakterisierung dieser konservierten Evasionsstrategien.

Das Ziel des Promotionsprojektes war die Charakterisierung der rekombinant exprimierten Proteine Ssl11 und PurA als Komplementevasionsproteine von *S. aureus*. Dazu sollte die Rekrutierung von Faktor H und dem weiteren abundanten Plasmaprotein und Komplementregulator Plasminogen analysiert werden. Die Oberflächenexpression der mikrobiellen Proteine sollte evaluiert werden. Weiterhin sollten die rekrutierten Regulatoren Faktor H und Plasmin(ogen) hinsichtlich ihrer komplementinhibierenden Aktivität untersucht werden. Ob die Phagozytose von *S. aureus* durch humane phagozytisch wirksame Zellen in Folge der mikrobiellen Proteine beeinflusst wird, ist ebenfalls Bestandteil der Untersuchungen. *In vivo* Versuche in *Galleria mellonella* (*G. mellonella*), der Wachsmottenlarve, dienen der ersten Überprüfung der *in vitro* erhobenen Ergebnisse im lebenden Organismus.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle herkömmlichen Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht explizit im Text erwähnt, von Sigma Aldrich (Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), Merck (Darmstadt) und AppliChem (Darmstadt) bezogen.

2.2 Mikroorganismen und Zellen

Für die Klonierung des Ssl11-Gens wurde *E. coli* DH5 α verwendet. *E. coli* BL21 Star DE3 diente der Proteinexpression des Ssl11. Für Bindungs- und Funktionsstudien wurden *S. aureus* Newman Liv 028 Wildtyp (WT), *S. aureus* Newman Δspa (zur Verfügung gestellt von PD Dr. Knut Ohlsen, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg), *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta sbi$ und *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ genutzt.

Für Phagozytose Untersuchungen wurden die Makrophagen Zelllinie THP-1 sowie aus *Buffy-Coats* (Leukozytenkonzentrate, Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Jena) frisch isolierte neutrophile Granulozyten verwendet.

2.3 Medien

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde Luria Bertani- (LB) Medium (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, pH 7,2) genutzt. Die *S. aureus* Stämme wurden in *tryptic soy broth*- (TSB) Medium (17 g/l pankreatisch abgebautes Casein, 3 g/l papainisch abgebautes Soja, 2,5 g/l Dextrose, 5 g/l NaCl, 2,5 g/l K₂HPO₄, pH 7,3, BD Bioscience, Heidelberg) oder *brain heart infusion*- (BHI) Medium (12,5 g/l Hirn-Infus Kalb, 5 g/l Hirn-Infus Rind, 10 g/l Pepton aus Casein C/GSX, 2 g/l Glukose, 2,5 g/l Na₂HPO₄, 5 g/l NaCl, pH 7,4, Serva, Heidelberg) kultiviert. *S. aureus* Stämme wurden auf Blutagarplatten (VWR, Darmstadt) angezogen und *E. coli* auf LB-Agarplatten (LB-Medium, 1,5% [w/v] Agar). Die Kultivierung von THP1-Zellen sowie neutrophiler Granulozyten erfolgte in RPMI 1640-Medium (Lonza, Verviers, Belgien).

2.4 Kultivierung von Mikroorganismen und Zellen

Folgende *S. aureus* Stämme wurden bei 37°C schüttelnd in TSB- oder BHI-Medium kultiviert: *S. aureus* Newman WT, Newman Δspa (supplementiert mit 100 µg/ml Spektinomycin), Newman $\Delta spa\Delta sbi$ (supplementiert mit 100 µg/ml Spektinomycin und 10 µg/ml Doxycyclin) und Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ (supplementiert mit 100 µg/ml Spektinomycin und 10 µg/ml Erythromycin). Der Ssl11 Expressionsstamm *E. coli* BL21 wurde bei 37°C schüttelnd in LB-Medium, supplementiert mit Ampicillin (100 µg/ml), inkubiert. Glycerinkulturen dienten der langfristigen Lagerung der Mikroorganismen bei -80°C. Eine über-Nacht- (üN) Kultur wurde 1:1 mit 100 % [v/v] Glycerin versetzt und sofort eingefroren. Die Kultivierung der THP-1 Monozyten erfolgte im RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS), 1 % Ultraglutamin 1 und 550 µl/l Gentamicinsulfat bei 37°C, 5 % CO₂ sowie 90 % Luftfeuchte. Neutrophile Granulozyten wurden für jeden Versuch frisch aus *Buffy-Coats* isoliert. Mittels Ficoll-paqueTM PLUS-Beschichtung (GE healthcare, Frankfurt am Main) und anschließender Zentrifugation (25 min, 400 x g) wurden Erythrozyten und Leukozyten der *Buffy-Coats* separiert. Die neutrophile Granulozyten-Fraktion wurde isoliert und zunächst für 20 min mit 0,9 % [w/v] Natriumchlorid (NaCl) und 3 % [w/v] Dextran inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (jeweils 5 min, 150 x g) wurde der Überstand abgenommen. Durch Inkubation mit H₂O für 30 sek wurden verbleibende Erythrozyten lysiert und anschließend erneut zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit HBSS-Puffer (*Hank's Balanced Salt Sodium*, Lonza) wurden die isolierten neutrophilen Granulozyten in RPMI 1640-Medium aufgenommen und deren Anzahl mit dem Zellcounter (Casy 2, Schärfe System, Reutlingen) ermittelt.

2.5 Proteine

Die *S. aureus* Proteine Ssl11 (Strep-Tag) und PurA (His-Tag) wurden rekombinant in *E. coli* BL21 Star DE3 exprimiert (letzteres zur Verfügung gestellt von Martina Selle, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg). Ssl11 wurde anschließend gereinigt. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gpd2) ist ein *Candida albicans*- (*C. albicans*) Protein, welches in der Hefe *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) exprimiert wurde (zur Verfügung gestellt von Andre Frühauf, Leibniz Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut Jena). Ebenfalls in *P. pastoris* exprimiert wurden CFHR1, FHL-1 sowie die Faktor H-Fragmente SCRs

1-5, SCRs 1-6, SCRs 1-7, SCRs 8-11, SCRs 8-20, SCRs 15-18, SCRs 18-20 und SCRs 19-20 (zur Verfügung gestellt von Nadine Flach, Leibniz Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut Jena) (Luo et al. 2009). In Kürze: *P. pastoris* wurde in Komplexmedium (70 % Hefeextrakt-Pepton-Medium [1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton], 10 % 1 M Kaliumphosphatpuffer [868 mM KH_2PO_4 , 132 mM K_2HPO_4 , pH 6,0], 10 % 10x Hefe-Stickstoff-Medium [134 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], 0,2 % Biotin, 1 % Methanol) für 3 Tage bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Die Proteinexpression wurde alle 24 h mit 1 % Methanol induziert. Anschließend wurden die Überstände gesammelt, filtriert und das jeweilige Protein mittels His-Tag affinitätschromatografisch gereinigt. Folgende Proteine wurden käuflich erworben: die Komplementproteine Faktor H, Faktor I (Complement Technologies, Tyler, TX, USA), Plasminogen und uPa (Technoclone, Wien, Österreich), SAK (MyBioSource, San Diego, CA, USA), Fibrinogen (Calbiochem, San Diego, CA, USA) sowie LPS (Sigma Aldrich, Taufkirchen).

2.6 Proteinexpression und -reinigung von Ssl11

Das *ssl11*-Gen wurde mittels Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) aus genomischer DNA von *S. aureus* amplifiziert. Es wurden die Primer *Ssl11 for* (5'-ATGGTAGGTCTCAAATGAGTACATTAGAGGTTAGATCACAAG-3') und *Ssl11 rev* (5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCTTAAATTCACCTTCAATTTTCTCTATATTTTC-3') verwendet. Das Amplikon wurde in den pPR-IBA1-Vektor (Iba GmbH, Göttingen) kloniert und in *E. coli* DH5 α transformiert (zur Verfügung gestellt von Prof. Susanne Engelmann, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, Institut für Mikrobiologie). Anschließend wurde das Plasmid in den Expressionsstamm BL21 Star DE3 transformiert. Die Expression von Ssl11 wurde durch Zugabe von 1 mM Isopropyl β -D-Thiogalaktosidase (IPTG) induziert und die Kultivierung des *E. coli* Stammes erfolgte für 4 h. Die Lyse der *E. coli*-Zellen erfolgte in Lysepuffer (50 mM Kaliumphosphat, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 % [v/v] Glycerol, 0,5 % [v/v] Triton X-100, 10 mM Imidazol, pH 7,8). Es folgte ein dreimaliges Einfrieren der Lyseproben in Flüssigstickstoff und Auftauen bei 42°C. Nach 30 min Zentrifugation bei 5500 x g wurde der Überstand, der das Ssl11 enthielt zur Vorbereitung der affinitätschromatographischen Reinigung mit DPBS (Lonza) verdünnt und sterilfiltriert. Die Affinitätschromatographie erfolgte über den rekombinant exprimierten C-terminalen

Strep-Tag. Die Eluatfraktionen des Ssl11 wurden mit einem Silbergel auf die Reinheit des Proteins geprüft und anschließend vereinigt, konzentriert und in DPBS aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (NanoDrop, peqlab, Erlangen) und mittels eines BCA-Kits. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

2.7 Antikörper und Antiseren

Rekombinant exprimiertes Ssl11 (0,4 mg) wurde verwendet, um Kaninchen zu immunisieren und polyklonales Kaninchen Ssl11 Antiserum (Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg) zu generieren. Mittels Western Blot Analysen wurde das generierte Antiserum auf dessen Potential, Ssl11 zu detektieren, untersucht. Das polyklonale Kaninchen CFHR1 Antiserum wurde ebenfalls im Haus generiert (Andrea Hartmann, Leibniz Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut Jena, in Kooperation mit Eurogentec, Lüttich, Belgien). Es wurden polyklonale Antiseren Ziege Faktor H und Ziege C3 (Complement Technologies), polyklonales Ziege Plasminogen und Fibrinogen Antiserum (Acris Antibodies, San Diego, USA) bezogen. Folgende monoklonalen Antikörper wurden verwendet: α C3b (Fitzgerald, Acton, MA, USA), α C5b-9 (Dako, Glostrup, Dänemark), α C3d (Complement Technologies). Weiterhin wurden die monoklonalen α Faktor H Antikörper T13 (SCRs 15-19), B22 (SCR 5), L20 (SCR 19), C18 (SCR 20), C21 (SCRs 15-18) und H04 (SCRs 8-20) (Oppermann et al. 2006) genutzt. Die HRP-konjugierten polyklonalen Ziege- (AgriSera, Vännäs, Schweden oder Dako), Kaninchen und Maus- (beides Dako) Antiseren stellen sekundäre Antikörper dar, ebenso wie der HRP-konjugierte *Strep*MAB-Classic-Antikörper (Iba GmbH) und die Alexa647-konjugierten polyklonalen Maus und Ziege Antiseren (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

Normales humanes Serum (NHS) wurde nach Absprache von gesunden Spendern gewonnen, vereint und bei -80°C gelagert. Die Inaktivierung von NHS erfolgte durch Zugabe von 10 mM EDTA.

2.8 Mutantenerstellung durch Phagentransduktion

Zur Generierung von Ssl11-defizienten *S. aureus* Stämmen wurden Phagen verwendet. Es wurde eine Ssl11-Insertionsmutante aus der Nebraska Transposon Mutanten-Bibliothek NARSA (zur Verfügung gestellt von PD Dr. Knut Ohlsen, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg) genutzt. Aus dem artifiziellen,

plasmidfreien *S. aureus* Stamm USA300 JE wurde die mittels Transposons erstellte Insertionsmutante des Ssl11 via Phagentransduktion in den *S. aureus* Newman und *S. aureus* Newman Δspa integriert. Zur Erstellung eines Phagenlysats wurden 20 ml der *S. aureus* üN-Kultur mit 1 M CaCl_2 versetzt. Die Phagen wurden 1:100 in Phagenpuffer (LB-Medium, 5 mM CaCl_2) verdünnt. 300 μl der üN-Kultur wurden bei 52°C für 2 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μl der verdünnten Phagensuspension. Der Ansatz wurde 2 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden 4 ml eines auf 55°C vorgewärmten Softagars (LB-Medium, 0,6 % [w/v] Agar) zum Ansatz gegeben und die Suspension auf eine LB-Platte transferiert, welche üN bei 37°C inkubiert wurde. Um den Softagar von der LB-Platte zu lösen, wurden 2 ml des Phagenpuffers zugefügt, der Softagar vorsichtig abgelöst und in ein neues Gefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 6000 rpm für 30 min wurde der Überstand, welcher das generierte Phagenlysate darstellt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Für die Transduktion der Phagen wurden 10 ml einer üN-Kultur des Rezipientenstammes mit 1 M CaCl_2 versetzt. 300 μl dieser Kultur wurden bei 52°C für 2 min inkubiert. Anschließend wurden 100 μl des hergestellten Phagenlysats zugegeben und die Suspension bei RT für 30 min inkubiert. Es wurde erneut auf 55°C erhitzter Softagar (2 ml) hinzugefügt, die Suspension auf eine antibiotikahaltige LB-Platte überführt und üN bei 37°C inkubiert. Die Phagentransduktion wurde durch eine darauffolgende PCR, in der Lysate der erhaltenen *S. aureus* Klone als DNA-*template* dienen, überprüft.

2.9 PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR dient der Amplifizierung genau definierter DNA-Bereiche. In dieser Arbeit wurde die PCR zum Nachweis der Phagentransduktion der Ssl11-Insertionsmutante in die Protein A-Mutante des *S. aureus* Newman (Newman Δspa) eingesetzt. Genutzt wurde die DNA-Polymerase GoTaq® Flexi (Promega, Madison, WI, USA). Die Primer ssl11_up for (5'-ACAACAGGGATGATTACAACTACTGCTCAGC-3') sowie 3' bursa aur 500bp rev (5'-TTAGCCTGCCATGATGTATACATTGTGTGAG-3'), dNTPs, GoTaq-Puffer, MgCl_2 , H_2O und Bakterienlysate als *template* wurden nach Angaben des Herstellers pipettiert. Der PCR-Ablauf war wie folgt: initiale Denaturierung (5 min 94°C), 30 Zyklen mit jeweils Denaturierungs- (30 sek 94°C), *Annealing*- (Anlagerung) der Primer (30 sek, 53°C) und Elongationsphase (2 min

68°C). Die PCR-Produkte wurden für die Agarose-Gelelektrophorese mit Ladepuffer (50 % [v/v] TE-Puffer, 49,2 % [v/v] Glycerin, 0,04 % [v/v] Xylencyanol, 0,04 % [v/v] Bromphenolblau) versetzt und in einem 1 %igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer (50x: 2 M Tris, 5,7 % [v/v] Eisessig, 50 nM EDTA pH 8) bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte eine Färbung mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml), eine Entfärbung mit H₂O sowie die Auswertung unter UV-Licht durch ein Geldokumentationssystem.

2.10 Proteinarray

Der Proteinarray der Firma Alere Technologies GmbH (Jena) ermöglicht die schnelle Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen. Die Proteine des Arrays sind virulenzassoziiert, hypothetisch virulenzassoziiert oder oberflächenassoziiert mit bisher unbekannter Funktion für den Mikroorganismus. Es befinden sich unterschiedliche Konzentrationen jedes Proteins auf dem Array. Angegebene Werte beziehen sich auf Signale bei der jeweiligen Maximalkonzentration. Diese reichen von 0,45 bis 0,8 mg/ml. Die Proteine liegen jedoch, unabhängig der Maximalkonzentration, in Sättigung vor. Im Rahmen der Etablierung dieser Methode wurden verschiedene Protokolle getestet, von denen zwei in dieser Arbeit verwendet wurden.

1) Zunächst wurde der Proteinarray Staph-Toxin-Ag02 verwendet, welcher 46 immobilisierte rekombinant exprimierte, oberflächenexponierte sowie intrazelluläre *S. aureus* Proteine umfasst. Es erfolgte ein Waschschrift mit Puffer (PBS 0,1 % [v/v] FCS, 0,05 % [v/v] Tween-20, 0,25 % [v/v] TritonX-100) bei 400 rpm für 5 min. Inkubationen erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, bei 37°C. Unspezifische Bindestellen wurden für 5 min bei 300 rpm mit Blockpuffer (PBS, 0,05 % [v/v] Tween-20, 90 % [v/v] FCS) inkubiert. Es wurde mit Faktor H (10 µg/ml) bei 300 rpm für 30 min inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde polyklonales Ziege Faktor H Antiserum (1:1000) sowie darauffolgend HRP-konjugiertes polyklonales Ziege Antiserum (1:1000) für jeweils 30 min bei 300 rpm zugegeben. Nach zwei finalen Waschschriften wurde das Substrat D1 (Alere Technologies GmbH) bei 25°C für 10 min ohne schütteln inkubiert. Die Proben wurden vermessen (ArrayMate Alere Technologies GmbH). Aus den Rohdaten wurden mittels der Software *Icono clust* (Alere Technologies GmbH) Messwerte generiert.

2) Das zweite Protokoll wurde von Dr. Peggy Kloppot (Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, Institut für Mikrobiologie) durchgeführt. Es wurde der Staph-Toxin-Ag03

genutzt, welcher 64 immobilisierte Proteine aufweist. Die Inkubationstemperatur betrug 25 °C. Die Zusammensetzung von Waschpuffer (PBS; 0,1 % [v/v] Blockpuffer von Roche, 0,05 % [v/v] Tween-20, 0,25 % [v/v] TritonX-100) und Blockpuffer (1 % [v/v] *Blocking Reagent*, Roche, Basel, Schweiz) unterscheidet sich vom ersten Protokoll, wohingegen Inkubationszeiten wie rpm-Angaben übereinstimmen. Es wurde die Bindung des Proteins Glu-Plasminogen (Haemochrom Diagnostica GmbH) untersucht. Zur Detektion wurden das polyklonale Ziege Plasminogen Antiserum (1:15000) sowie HRP-konjugiertes polyklonales Ziege Antiserum (1:7500 für Plasminogen) verwendet.

2.11 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der ELISA diente im Rahmen dieser Arbeit der Identifikation und Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen. Ssl11, PurA, Gpd2, Gelatine und C3b (jeweils 5 µg/ml oder äquimolar in DPBS) wurden auf Mikrotiterplatten (Nunc, maxisorb, Rochester, NY, USA oder Sarstedt, HiBind, Nümbrecht) immobilisiert (ÜN, 4°C oder 1 h, 37°C). Die Blockierung unspezifischer Bindestellen erfolgte mit Waschpuffer (PBSII [140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4], 0,5 % [v/v] Tween-20) und 2 % [w/v] BSA oder AppliChem Blockpuffer I bei 37°C bzw. bei RT für mindestens 1 h. Zwischen jedem Inkubationsschritt erfolgte ein dreimaliges waschen. Die Liganden Faktor H, FHL-1, CFHR1, Plasminogen (jeweils 0,01-10 µg/ml), Faktor H-Fragmente (äquimolarer Einsatz) sowie inaktiviertes NHS (iNHS, 0,02-5 %) wurden 1 h bei RT inkubiert. Zur Detektion der Bindung wurden folgende Antiseren verwendet: polyklonales Kaninchen CFHR1, polyklonales Ziege Faktor H (für Faktor H sowie FHL-1) und polyklonales Ziege Plasminogen Antiserum (jeweils 1:1000) sowie die HRP-konjugierten polyklonalen Ziege und Kaninchen Antiseren (je 1:2500). Primäre Antikörper wurden in Waschpuffer oder AppliChem *Cross-Down* Puffer verdünnt, sekundäre jeweils in Waschpuffer. Als Substrat diente TMB (eBioscience, San Diego, CA, USA). Abgestoppt wurde die Entwicklungsreaktion mit 0,25 M Salzsäure. Die Absorption wurde bei 450 nm vermessen.

In Inhibitions-ELISAs wurde der inhibitorische Einfluss von NaCl, εACA und Faktor H-Antikörpern auf die Bindung von Ssl11 und PurA an Faktor H bzw. Plasminogen untersucht. NaCl (0,125-1 mM) wurde zusätzlich zum Liganden Faktor H oder Plasminogen und εACA (0,1-10 mM) zu Plasminogen gegeben. Die monoklonalen Faktor H-Antikörper T13, B22, L20, C18, C21 und H04 (je 2 µg) wurden jeweils mit

Faktor H versehen und dann mit den immobilisierten Proteinen inkubiert. Der weitere Versuchsaufbau entspricht dem oben beschriebenen.

Für Kompetitions-ELISAs wurden konstante Mengen Faktor H (10 µg/ml) und verschiedene Konzentrationen Plasminogen (1,25-40 µg/ml) bzw. konstante Mengen Plasminogen (2,5 µg/ml) sowie unterschiedliche Faktor H- Konzentrationen (1,25-40 µg/ml) als Liganden des immobilisierten mikrobiellen Ssl11 eingesetzt. Die Detektion der Bindung mittels der proteinspezifischen Antiseren erfolgte für beide Ansätze jeweils parallel für Faktor H und Plasminogen.

2.12. Proteinbiotinylierung und Affinitätsbestimmung via Biolayer

Interferometrie

Via Biolayer Interferometrie (BLitZ, forteBio, Menlo Park, CA, USA), einer Methode zur Echtzeit-Analyse von Protein-Protein-Interaktionen, werden die Assoziationsrate (k_a), die Dissoziationsrate (k_d) sowie die sich daraus ergebende Dissoziationskonstante ($K_D = k_a/k_d$), welche die Bindeaffinität darstellt, ermittelt. Während die Assoziationsrate beschreibt, wie viele Komplexe aus immobilisiertem Protein und Ligand sich in einer Sekunde in einer molaren Lösung bilden, beschreibt die Dissoziationskonstante, wie viele Komplexe in der gleichen Zeit zerfallen. Letzteres charakterisiert demnach die Stabilität der Bindung.

Die Biolayer Interferometrie erfordert den Einsatz von biotin-markiertem Ssl11. Die Biotinylierung des Ssl11 erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Biotin, welches im zehnfach molaren Überschuss vorlag. Biotin geht eine Interaktion mit freien Aminogruppen ein. Im letzten Schritt wurde freies Biotin mit einer Centripure Mini Spin Säule PBS Z25 (emp Biotech, Berlin) durch Zentrifugation (1 min, 1000 x g) entfernt.

Nach einer Äquilibration mit DPBS für 20 sek wurde biotinyliertes Ssl11 (50 µg/ml) für 120 sek auf einem Streptavidin (SA) Sensor (forteBio) immobilisiert bzw. his-getaggt PurA (20 µg/ml) für 120 sek auf Nickel NTA Sensoren (forteBio) immobilisiert. Nach einem Waschschrift mit DPBS für 30 sek wurden verschiedene Mengen an Faktor H (Ssl11: 15-750 nM, PurA: 1-610 nM) und Plasminogen (Ssl11: 250-5000 nM, PurA: 125-1000 nM), verdünnt in DPBS zugefügt. Die Assoziation der Liganden an immobilisierte mikrobielle Proteine erfolgte für 120 sek bzw. 240 sek in Echtzeit. Durch erneute Zugabe von DPBS wurde zudem, ebenfalls für 120 bzw.

240 sek die Dissoziation bestimmt. Die Signale der Bindung von DPBS an immobilisiertes Ssl11 und PurA dienten als Referenz für die Berechnung der Bindungsaffinität durch die BlitzProTM 1.2 Software (Pall forteBio Europe, Portsmouth, Vereinigtes Königreich).

2.13 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE diene der Proteinauftrennung nach dem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel, bestehend aus einem 10 %igen Trenngel (Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1), 1,5 M Tris-HCl, 100 mg/ml Ammoniumperoxodisulfat (APS), 10 % [v/v] SDS, 0,1% [v/v] Tetramethylethyldiamin (TEMED), pH 8,8) und einem 4 %igen Sammelgel (Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,5 M Tris-HCl, 100 mg/ml APS, 10 % [v/v] SDS, 0,1% [v/v] TEMED, pH 6,8). Der Laufpuffer für die Elektrophorese setzte sich aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % [v/v] SDS (pH 8,3) zusammen. Die Proteinproben wurden entweder mit reduzierendem Ladepuffer RotiLoad I versetzt und bei 95°C 5 min erhitzt oder mit nicht reduzierendem Ladepuffer (5x= 3,8 % [v/v] Tris, 5 % [v/v] SDS, 50 % [v/v] Glycerin, 1 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt. Die SDS-PAGE erfolgte bei 130 V für etwa 1 h. Als Größenstandard diene der *PageRulerTM Prestained Protein Ladder*.

2.14 Western Blot

Zur Detektion spezifischer Proteine können mittels SDS-PAGE separierte Proteine aus dem Polyacrylamid (PAA) Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Es wurde das Trans Blot Turbo Transfer System (12 V, 12- 14 min, Biorad, Hercules, CA, USA) verwendet. Die Nitrozellulosemembran wurde in H₂O aktiviert. Whatmanpapier, das PAA-Gel und auch die Nitrozellulosemembran wurden in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 20 % [v/v] Methanol, 0,1 % [v/v] SDS, pH 8,3) getaucht und in die Blotkammer überführt. Nach dem Proteintransfer auf die Membran wurde diese mit Blockpuffer (PBSII, Tween-20, 4 % [w/v] Milchpulver, 1 % [w/v] BSA) inkubiert. Es wurde mit dem Primär- und zugehörigem HRP-konjugiertem Sekundärantikörper jeweils für 1 h bei RT oder üN bei 4°C inkubiert. Gewaschen wurde mit PBSII mit 0,05 % [v/v] Tween-20. Die Detektion erfolgte mit der Kamera Fusion Fx und der Software Fusion Capt Advance (Vilber Lourmat, Eberhardzell) nach vorhergehender Inkubation mit dem *Chemiluminate-HRP PicoDetect*.

2.15 Silberfärbung

Eine Silberfärbung dient im Anschluss an die SDS-PAGE der Detektion der aufgetrennten Proteine. Die PAA-Gele wurden für 30 min fixiert (30 % [v/v] Essigsäure). Es folgten zwei Waschschriffe für 10 min jeweils mit Ethanol (20 % [v/v]) und mit Wasser. Nach kurzer Inkubation mit Natriumthiosulfat (0,2 g/l) zur Sensibilisierung wurde mit Wasser gespült. Die Silberfärbung wurde dann mit Silbernitrat (2 g/l) für 30 min durchgeführt. Nach einem erneuten Waschschriff mit Wasser wurde das Silbergel entwickelt. Es wurde mit Entwicklerlösung (0,7 ml/l 37 % Formaldehyd, 30 g/l Natriumcarbonat, 10 mg/l Natriumthiosulfat) inkubiert, bis der gewünschte Färbegrad erreicht war. Die Reaktion wurde mit einer Lösung (50 g/l Trisbase, 2,5 % [v/v] Essigsäure) abgestoppt. Zum Trocknen wurden das Gel sowie zwei Zellophanfolien in Wasser getränkt. Das Gel wurde zwischen beiden Folien in einem Geltrocknungsrahmen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) eingespannt und üN getrocknet.

2.16 Komplementaktivierungsassay des alternativen Weges

Neben einer basalen Aktivierung, welche durch Komplementregulatoren moduliert wird, wird die Aktivierung des Komplements über den alternativen Weg mittels LPS induziert. Um zu untersuchen, ob die mikrobiellen Proteine die Aktivierung beeinflussen, wurden Ssl11, PurA, Gelatine und Gpd2 (je 0,75-6 µg/ml) mit 10 % NHS für 20 min bei 37°C inkubiert. Parallel wurde LPS (0,1 µg/ml) in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit Blockpuffer I inkubiert. Es folgte die Inkubation der Protein-NHS-Proben mit immobilisiertem LPS für 1 h bei 37°C. Die Komplementaktivierung wurde auf Ebene der C3-Konvertase mittels eines monoklonalen αC3b Antikörpers (1:1000) und auf Ebene des TCC mittels des monoklonalen αC5b-9 Antikörpers (1:1000), jeweils gefolgt vom HRP-konjugierten polyklonalen Maus Antiserum (1:2500) detektiert.

2.17 Kofaktorassay

Faktor H und FHL-1 als Kofaktoren unterstützen die Spaltung von C3b in dessen Spaltprodukte durch die Protease Faktor I. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch mikrobielle Proteine gebundenes Faktor H oder FHL-1 ebenfalls funktionell aktiv ist. Die Proteine Ssl11, PurA und Gelatine (10 µg/ml) wurden dazu immobilisiert. Es folgte die Inkubation mit Blockpuffer I für 1 h bei 37°C sowie die Inkubation mit 2 µg Faktor H bzw. FHL-1 für 1 h bei 37°C. Einem Waschschriff folgte

die Inkubation mit C3b (10 µg/ml) und Faktor I (2,8 µg/ml) für 0,5 h, 1 h, 2 h und 3 h bei 37°C. Eine Flüssigphasekontrolle bestand aus Faktor H bzw. FHL-1, Faktor I und C3b in den indizierten Konzentrationen. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C. Die Reaktionen wurden mit RotiLoad I abgestoppt und bei 95°C für 5 min erhitzt. Anschließend wurden die Proteinproben via SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion von C3b-Spaltprodukten erfolgte mit dem polyklonalen Ziege C3 Antiserum (1:2000) sowie dem HRP-konjugierten polyklonalen Ziege Antiserum (1:2500).

2.18 Plasmin(ogen)-Spaltung von S-2251, C3b und Fibrinogen

Plasminogen ist die inaktive Form der Protease Plasmin, welche diverse Liganden spaltet. Es wurde untersucht, ob humane und mikrobielle Aktivatoren das an mikrobielle Proteine gebundene Plasminogen zur aktiven Protease Plasmin aktiviert. Die Proteine Ssl11, PurA, BSA oder Plasminogen (je 10 µg/ml) wurden immobilisiert und 1 h bei 37°C mit Blockpuffer I versehen. Nach anschließender Inkubation mit Plasminogen für 1 h bei 37°C wurde das Substrat S-2251 sowie uPa oder SAK hinzugefügt. Über 24 h wurde dann bei 37°C die Umsetzung des chromogenen Substrats S-2251 durch Plasmin in einem SpectraMax Plattenreader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA) bei 405 nm detektiert. In weiteren Versuchen wurden jeweils C3b oder Fibrinogen (je 1 µg) anstelle des S-2251 sowie ein Plasminogen-aktivator (uPa oder SAK) mit Plasminogen inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h und 20 h. Die Spaltung von Fibrinogen durch an Ssl11 gebundenes Plasmin(ogen) wurde zu den Zeitpunkten 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h und 4 h wie folgt untersucht: die Reaktionen wurden mit nicht reduzierendem Ladepuffer abgestoppt, via SDS-PAGE separiert und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Der C3b-Abbau wurde mittels des polyklonalen Ziege C3 Antiserums (1:2000) bzw. Fibrinogen via polyklonalem Ziege Fibrinogen Antiserum (1:1000) detektiert. Anschließend wurde für C3b sowie Fibrinogen das HRP-konjugierte polyklonale Ziege Antiserum (1:2500) als Sekundärantikörper zugegeben.

2.19 Lokalisierung von Ssl11

Ssl11 ist ein sezerniertes Protein von *S. aureus* (Fraser und Proft 2008). Um zu ermitteln, ob es ausschließlich extrazellulär vorliegt, oder auch auf der mikrobiellen Oberfläche lokalisiert ist, wurden der Überstand, die Membranfraktion sowie das Zytosol von *S. aureus* auf das Vorhandensein von Ssl11 untersucht. Durch das

Antibiotikum Gramicidin wird Membranporenstress auf der Staphylokokkenoberfläche ausgelöst, was das Zweikomponentensystem SaeRS aktiviert und die Expression von Ssl11 induziert (Benson et al. 2012). Zur Titration einer geeigneten Gramicidin-konzentration wurde zunächst ein Wachstumsversuch durchgeführt. *S. aureus* Newman WT wurde in TSB, supplementiert mit Gramicidin (0, 10, 20 und 40 µg/ml), aus einer üN-Kultur beimpft und 24 h bei 37°C inkubiert. Das Wachstum wurde photometrisch bei 600 nm (Spectra Max Plattenreader) detektiert. Für die Analyse der Ssl11-Lokalisation wurden die Stämme *S. aureus* Newman Δspa , Newman $\Delta spa \Delta sbi$ sowie Newman $\Delta spa \Delta ssl11$ in mit 40 µg/ml Gramicidin supplementiertem BHI Medium für 6,5 h bei 37°C kultiviert.

Zur Detektion von Ssl11 in der Membran von *S. aureus* wurde jeweils 1 ml der Kultur entnommen und zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet für 30 min bei 37°C schüttelnd mit Lysostaphin (37,5 µg) und Lysozym (180 µg) inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden das Zellpellet sowie der Überstand in nicht reduzierendem Ladepuffer resuspendiert.

Um das Zytosol auf das Vorhandensein von Ssl11 zu analysieren, wurden *S. aureus* Zellen aus 1 ml Kultur mechanisch mittels eines Ribolysers (*Precellys 24*, Bertin Technologies, Rockville, MD, USA) lysiert. Durch anschließende Zentrifugation wurden Zelltrümmer und Glasperlen vom Proteinextrakt, der die zytosolische Fraktion darstellt, getrennt. Die Proben wurden für die SDS-PAGE in nicht reduzierendem Laufpuffer aufgenommen.

Die Proteinfällung von 80 ml Kulturüberstand mit 10 % [w/v] Trichloressigsäure (TCA) üN bei 4°C ermöglichte die Untersuchung, ob Ssl11 im Sekretom von *S. aureus* detektierbar ist. Nach Zentrifugation bei 10000 rpm für 1 h wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 % [v/v] Ethanol aufgenommen. Das Pellet wurde noch zweimalig mit 100 % [v/v] und einmal mit 70 % [v/v] Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml Fällungspuffer (8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff) aufgenommen. Zur Vorbereitung der SDS-PAGE wurde nicht reduzierender Probenpuffer zugesetzt.

Alle Proteinfractionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Ssl11 wurde dann mit dem polyklonalen

Kaninchen Ssl11 Antiserum (1:500) und dem HRP-konjugierten polyklonalen Kaninchen Antiserum (1:2500) detektiert.

2.20 Bindung von Faktor H und Plasminogen an *S. aureus*

S. aureus bindet die Komplementregulatoren Faktor H (Sharp et al. 2012) und Plasminogen (Mölkänen et al. 2002). Um zu untersuchen, ob membrangebundenes Ssl11 die jeweilige Bindung beeinflusst, wurde, unter Nutzung von *S. aureus* Spa- und Ssl11-Mutanten, die Bindung via Durchflusszytometrie analysiert. *S. aureus* Newman $\Delta spa \Delta ssl11$ und Newman Δspa wurden bis zu einer OD_{540nm} von 1,0 kultiviert. Anschließend wurden die *S. aureus* Stämme mit 10 % und 20 % iNHS inkubiert. Die Faktor H-Bindung wurde mit dem monoklonalen α Faktor H Antikörper T13 (1:100) und Alexa Fluor®647-konjugiertem polyklonalen Maus Antikörper (1:400) nachgewiesen. Die Plasminogen-Bindung wurde mittels des polyklonalen Ziege Plasminogen Antiserums (1:100) und des Alexa Fluor®647-konjugierten polyklonalen Ziege Antiserums (1:400) gezeigt. Die Bindung von Faktor H bzw. Plasminogen an *S. aureus* Mutanten wurde am BD LSRII (BD Bioscience, Heidelberg) mit der Software FACS Diva 6.2 (BD Bioscience) gemessen. Zur Datenauswertung wurde die Software FlowJo7.2.5 (Flowjo LLC) verwendet.

2.21 C3b-Deposition auf der *S. aureus* Oberfläche

Komplementaktivierung führt zur Opsonisierung von Erregeroberflächen mit C3b. In dieser Arbeit wurde geprüft, ob Ssl11 die Deposition von C3b auf *S. aureus* beeinflusst. *S. aureus* Newman $\Delta spa \Delta ssl11$ und Newman Δspa wurden bis zu einer OD_{540nm} von 1,0 kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer (DPBS [+Ca²⁺/Mg²⁺], 1 % [w/v] BSA) erfolgte anschließend die Inkubation der *S. aureus* Stämme mit 10 % NHS, verdünnt in Waschpuffer, bei 37°C und 400 rpm. Die C3b-Deposition wurde mit Hilfe eines monoklonalen α C3d Antikörpers (1:300) und eines Alexa Fluor®647-konjugierten polyklonalen Maus Antiserums (1:400) detektiert, jeweils gefolgt von zweimaligen Waschschritten. Für beide *S. aureus* Stämme wurde die C3b-Deposition nach 20 min am BD LSRII (BD Bioscience) mit der Software FACS Diva 6.2 (BD Bioscience) erfasst. Die Daten wurden mit der Software FlowJo7.2.5 (Flowjo LLC) ausgewertet.

2.22 Phagozytose von *S. aureus* durch Makrophagen und neutrophile

Granulozyten

Weitere Untersuchungen sollten klären, ob die durch Ssl11 reduzierte C3b Deposition auf der *S. aureus* Oberfläche auch eine reduzierte Phagozytoserate hervorruft. Dazu wurden *S. aureus* Newman $\Delta spa \Delta ssl11$ und Newman Δspa üN bei 37°C in TSB-Medium kultiviert. Staphylokokken wurden mit *BacLight green* gefärbt, indem der Farbstoff (10 µM) für 30 min bei RT mit den Staphylokokken Stämmen in Waschpuffer (PBS, 0,05 % [v/v] Tween-20) inkubiert wurde. Anschließend wurden die Stämme viermal gewaschen, um überschüssiges *BacLight green* zu entfernen. Die Staphylokokken wurden dann mit 10 % NHS für 20 min bei 37°C opsonisiert und zweimal gewaschen. Während der letzten Waschschrte wurden die Bakterien, statt in Waschpuffer, in RPMI-Medium aufgenommen. Neutrophile Granulozyten wurden, wie zuvor beschrieben (**Kap. 2.4**), frisch isoliert. Zur Untersuchung der Phagozytose durch Makrophagen wurden THP-1 Monozyten verwendet, die durch 0,4 µg/ml Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) zu Makrophagen stimuliert wurden. Die Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten wurden mit DiD (Membranfärbung) und DAPI (DNA Färbung) für 30 min bei 37°C gefärbt und anschließend zweimal mit RPMI Medium gewaschen.

Durchflusszytometrie

Der Anteil an phagozytierten *S. aureus* durch humane Makrophagen und neutrophile Granulozyten wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierfür wurden die gefärbten immobilisierten Makrophagen in 24-well-Zellkulturplatten bei 37°C mit gefärbten *S. aureus* inkubiert. Zur Probengewinnung wurde nach jeweils 4 h der Überstand verworfen, die Makrophagen einmal mit Trypsin/ EDTA gewaschen, in Trypsin/ EDTA in Suspension gebracht und in vorgekühlte FACS Röhrchen überführt. Die gefärbten neutrophilen Granulozyten wurden zusammen mit *S. aureus* bei 37°C und 300 rpm inkubiert, wobei die entsprechenden Probenahmen hier nach 25 min erfolgten. Die Phagozytose wurde abgestoppt, indem die Proben in eiskalt vorgekühlte FACS Röhrchen pipettiert wurden. Die Phagozytose von *S. aureus* durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen wurde am BD LSRII (BD Bioscience) mit der Software FACS Diva 6.2 (BD Bioscience) detektiert und die Daten mit der Software FlowJo 7.2.5 (FlowJo LLC) ausgewertet.

Fluoreszenzmikroskopie

Um die Phagozytose von *S. aureus* durch neutrophile Granulozyten zu visualisieren und um zwischen Adhäsion und Phagozytose unterscheiden zu können, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Zur Erstellung von fixierten Proben wurden Deckgläschen (Ø 13 mm) in Vertiefungen von Mikrotiterplatten platziert. Nach fünfminütiger Inkubation mit 70 %igem Ethanol wurden die Deckgläschen für 20 min mit Poly-L-Lysin beschichtet, der Überstand abgenommen und die Deckgläschen für 5 min getrocknet. Die gefärbten Staphylokokken und neutrophilen Granulozyten wurden bei einer *multiplicity of infection* (MOI) von 10 für 40 min bei 37°C auf den beschichteten Deckgläschen inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 4 % [w/v] eiskaltem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nachdem einmal mit H₂O gewaschen wurde, wurden die präparierten Deckgläschen auf Roti®-Mount FluorCare auf einem Objektträger platziert. Um die Phagozytose lebender Zellen mikroskopisch zu untersuchen, wurden gefärbte neutrophile Granulozyten und gefärbte *S. aureus* gemeinsam in ein Kulturschälchen (*cell culture dish* 35/11MM, greiner bio one, Kremsmünster, Österreich) überführt und sofort im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss LSM710, Carl Zeiss, Oberkochen) mit der Software ZEN 2011 SP3 (blackedition) Version 8.1 (Carl Zeiss Microscopy, Jena) betrachtet.

2.23 Überlebensassay

Zur Analyse der Virulenz von Ssl11 und PurA wurden *S. aureus* Newman WT, Newman Δ ssl11 oder Newman Δ purA in BHI-Medium üN bei 37°C kultiviert. Pro Stamm wurden jeweils 1×10^7 Bakterien/ 20 µl in 20 *G. mellonella* Wachsmottenlarven injiziert. Das Überleben der Larven wurde bei 37°C zeitabhängig erfasst.

2.24 Statistische Methoden

Für die statistischen Analysen wurde der ungepaarte Student's t-Test verwendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $\leq 0,05$ betrachtet (* $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$).

3. Ergebnisse

3.1 Rekrutierung von Faktor H durch Ssl11 und PurA

3.1.1 Ssl11 und PurA sind Faktor H-bindende Proteine von *S. aureus*

Um dem Komplementsystem zu entkommen, exprimiert *S. aureus* eine Vielzahl von Proteinen, welche Komplementregulatoren binden. Es ist es sehr wahrscheinlich, dass es bisher unbekannte Immunevasionsproteine gibt, da in Proteomanalysen diverse Proteine mit unbekannter Funktion identifiziert wurden. Mit Hilfe des Proteinarrays der Firma Alere Technologies GmbH wurde in kurzer Zeit die Bindung vieler immobilisierter Proteine an humane Proteine überprüft. Im Folgenden wurde die Bindung von 46 immobilisierten Staphylokokkenproteine an den Komplementregulator Faktor H untersucht. Faktor H wurde jeweils als Ligand zu den im Proteinarray immobilisierten Proteinen hinzugefügt.

Ssl11 und PurA wurden erstmals als Faktor H bindende Proteine identifiziert. EfbC sowie der C-terminale Teil des Sbi (Sbi3-4) banden ebenfalls Faktor H, wohingegen das N-terminale Sbi-Fragment (Sbi1-2) Faktor H nicht gebunden hat (**Abb. 3.1**).

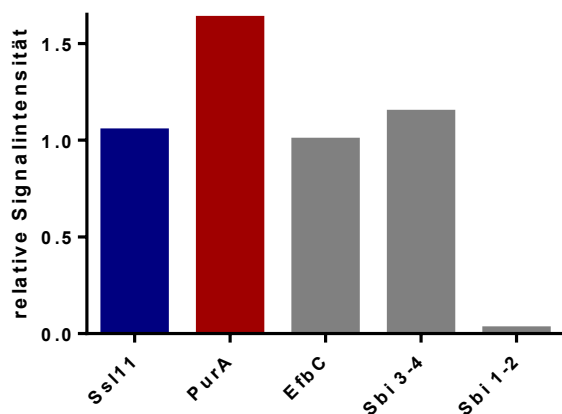


Abbildung 3.1: Ssl11 und PurA binden Faktor H. In einem Proteinarray gespottete *S. aureus* Proteine wurden auf die Bindung an Faktor H untersucht. Ssl11 und PurA banden Faktor H im Proteinarray und sind somit neu identifizierte Faktor H-bindende *S. aureus* Proteine. EfbC und Sbi3-4 als bekannte Faktor H-bindende Proteine wiesen eine vergleichbare Signalintensität auf. Sbi1-2 band Faktor H nicht. Die Signalintensitäten aller Proteine wurden auf EfbC normiert.

Nach der Identifizierung von Ssl11 und PurA als Faktor H-bindende Proteine wurde die entsprechende Bindung näher charakterisiert. Ssl11 wurde mit einem Strep-Tag in einem *E. coli*-Expressionsstamm rekombinant exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt (**Abb. 3.2**).

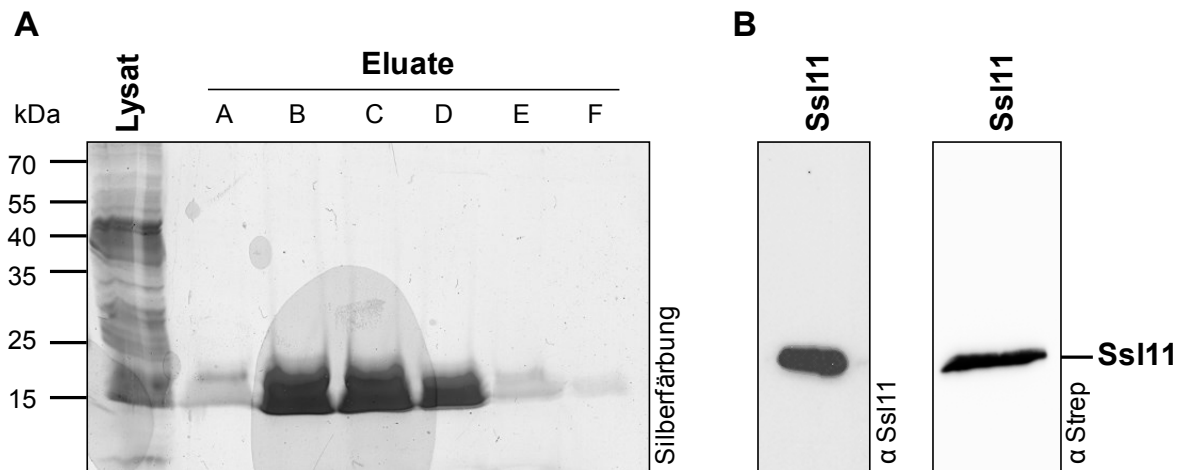
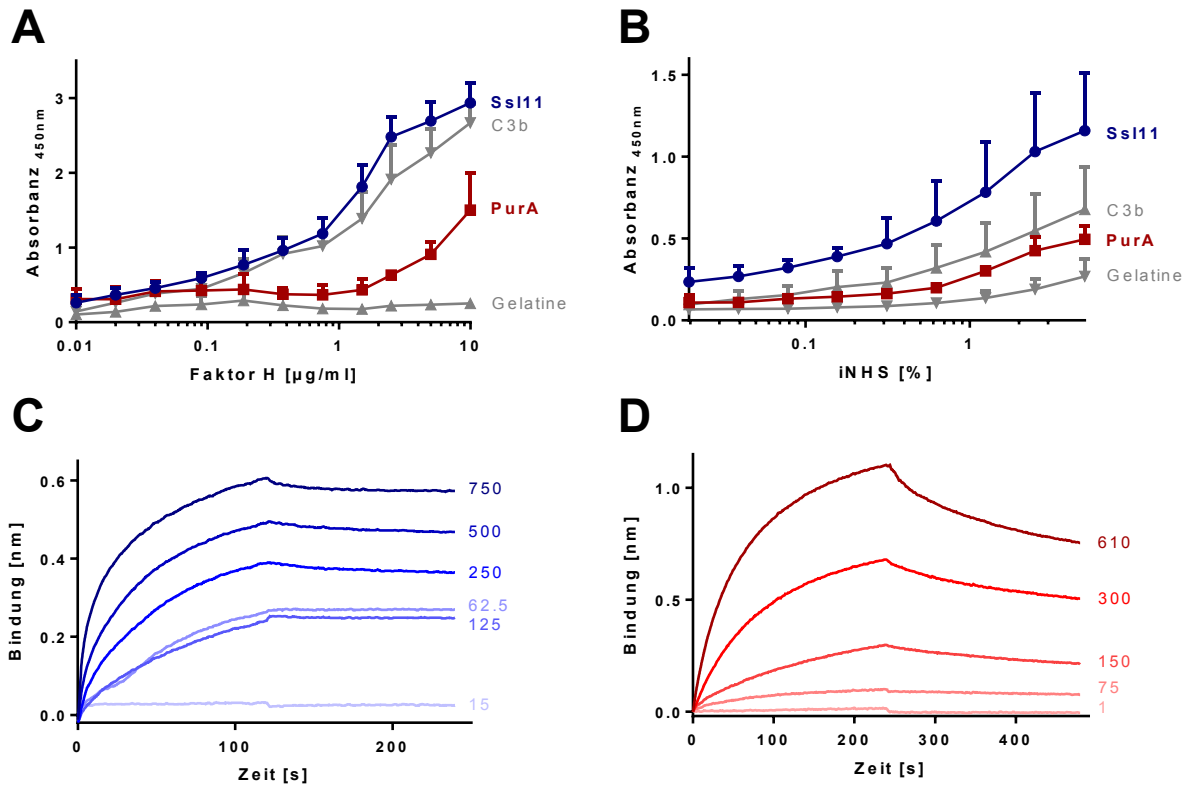


Abbildung 3.2: Rekombinante Expression und Reinigung von Ssl11. *Ssl11* wurde mittels PCR aus genomischer DNA von *S. aureus* amplifiziert und in *E. coli* mit einem C-terminalen Strep-Tag rekombinant exprimiert. Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie. **A** Rekombinantes Ssl11 wurde in den Elutionsfraktionen (A-F) und im Kulturüberstand aufgetrennt und im Gel mittels Silberfärbung nachgewiesen. **B** Das rekombinante Ssl11 wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und via Immunoblotting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das gereinigte Ssl11 wurde mit einem polyklonalen Ssl11 Antiserum sowie einem Strep Tag Antikörper detektiert.

Die Bindung von Ssl11 und PurA an Faktor H wurde in ELISA-Studien validiert. Die immobilisierten mikrobiellen Proteine Ssl11 und PurA wurden mit dem gereinigten Ligand Faktor H oder mit komplementinaktivem humanem Serum (iNHS) inkubiert. Ssl11 und PurA banden sowohl gereinigten Faktor H als auch Faktor H aus iNHS. Die Bindung war jeweils dosisabhängig (**Abb. 3.3A, Abb. 3.3B**).

Via Biolayer Interferometrie wurden die Assoziationsrate (k_a), die Dissoziationsrate (k_d) sowie die sich daraus ergebende Dissoziationskonstante ($K_D = k_a/k_d$), welche die Bindeaffinität darstellt, ermittelt. Die Proteine Ssl11 und PurA wurden auf einem Sensor immobilisiert. Die Messung der Bindung an den zugefügten Ligand Faktor H erfolgte in Echtzeit. Ssl11 band Faktor H mit einer Affinität von 2,56 nM. PurA band Faktor H mit 92,4 nM. Pro Sekunde bildeten sich 68900 Ssl11-Faktor H-Komplexe und 24200 PurA-Faktor H-Komplexe. (**Abb. 3.3C, Abb. 3.3D**).



	Ssl11*	PurA
K_D (nM)	2,56	92,40
k_a (1/Ms)	68900	24200
k_d (1/s)	0,000177	0,00224

Abbildung 3.3: Ssl11 und PurA binden Faktor H konzentrationsabhängig. **A** Die Bindung von Ssl11 und PurA an Faktor H wurde im ELISA untersucht. Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurden mit Faktor H (0,01-10 µg/ml) inkubiert. Ssl11 sowie PurA banden Faktor H dosisabhängig. **B** Die immobilisierten Proteine Ssl11 und PurA wurden mit iNHS (0,02-5 %) inkubiert. Ssl11 und PurA banden Faktor H aus komplement-inaktivem Serum. Die Bindung war jeweils dosisabhängig. Gelatine diente als Negativkontrolle und C3b stellte jeweils die Positivkontrolle dar. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standard-abweichungen (SA) aus drei unabhängigen Versuchen. **C** Die Bindungsaffinitäten von Ssl11 und PurA zu Faktor H wurden mittels Bi-layer Interferometrie analysiert. Zuvor biotinyliertes Ssl11 (Ssl11*) wurde auf einen Streptavidin Sensor beladen und mit Faktor H (nM) inkubiert. Ssl11* band dosisabhängig Faktor H. Aus den Einzelmessungen ergab sich eine Bindeaffinität von 2,56 nM von Ssl11 an Faktor H. **D** His-getaggtes PurA wurde auf einen Ni-NTA Sensor beladen und die indizierten Mengen Faktor H (nM) zugegeben. PurA band Faktor H ebenfalls dosisabhängig. Aus den Einzel-messungen ergab sich für die Bindung von PurA an Faktor H eine Affinität von 92,4 nM. Gezeigt sind die repräsentativen Diagramme aus jeweils drei unabhängigen Interferometrie-Versuchen. K_D = Dissoziationskonstante, k_a = Assoziationsrate, k_d = Dissoziationsrate.

3.1.2 Ssl11 und PurA binden verschiedene Faktor H-Regionen

Faktor H besteht aus 20 homologen SCR-Untereinheiten (**Abb. 3.4.A**). Die Faktor H-Binderegionen von Ssl11 und PurA wurden im Folgenden mittels ELISA-Studien analysiert. Dafür wurden immobilisiertes Ssl11 und PurA in äquimolaren Mengen mit Faktor H Fragmenten inkubiert.

Ssl11 band mit schwacher Intensität SCRs 18-20 (**Abb. 3.4C**). PurA hingegen band an Faktor H SCRs 1-7, SCRs 8-20 sowie SCRs 18-20 (**Abb. 3.4E**). Um die Bindungs-region von Ssl11 und PurA in Faktor H zu ermitteln, wurde Faktor H zudem mit monoklonalen Antikörpern vorinkubiert, welche spezifische Faktor H Regionen erkennen und somit als Binderegion blockieren (**Abb. 3.4.B**). Wurde Ssl11 mit diesen vorinkubierten Faktor H-Proben inkubiert, band Ssl11 Faktor H mit gleicher Intensität (**Abb. 3.4D**). PurA band weniger Faktor H, welcher mit dem monoklonalen Antikörper gegen SCR 20 vorinkubiert wurde (**Abb. 3.4F**).

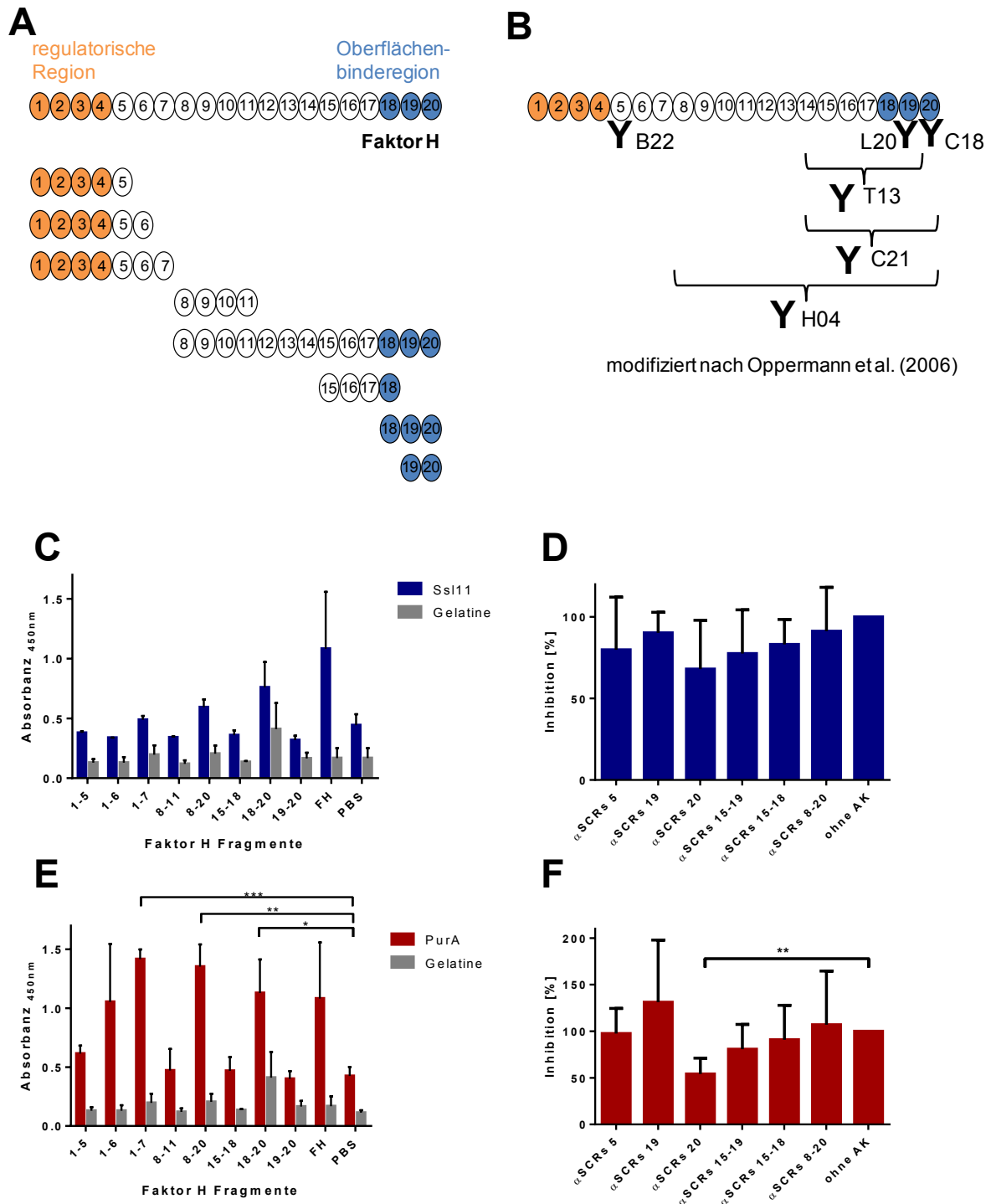


Abbildung 3.4: Lokalisierung der Faktor H-Binderegion für Ssl11 und PurA. **A** Faktor H besteht aus 20 homologen strukturellen Untereinheiten. Die dargestellten Faktor H-Proteinfragmente wurden rekombinant exprimiert und aufgereinigt. **B** Faktor H wurde mittels verschiedener monoklonaler Antikörper detektiert. Die monoklonalen Antikörper erkennen Faktor H an den jeweils dargestellten SCRs. **C** Um festzustellen, wo die Faktor H Bindestellen für Ssl11 lokalisiert sind, wurde immobilisiertes Ssl11 in einem ELISA mit den Faktor H Proteinfragmenten inkubiert. Ssl11 zeigte keine spezifische Bindung an die getesteten Faktor H Proteinfragmente. **D** Monoklonale Faktor H-Antikörper, welche spezifische Faktor H Regionen erkennen, wurden mit Faktor H vorinkubiert, sodass deren Binderegion in Faktor H blockiert ist. Es wurde im ELISA untersucht, ob immobilisiertes Ssl11 mit unterschiedlicher Intensität an Faktor H und mit Antikörpern vorinkubiertem Faktor H band. Ssl11 band mit gleicher Intensität Faktor H sowie Faktor H, in welchem spezifische Binderegionen durch Antikörper blockiert sind. Die ermittelten Werte sind normiert auf Faktor H, welches nicht mit einem

Antikörper inkubiert wurde. **E** Zur Lokalisierung der Faktor H Binderegion für PurA wurde immobilisiertes PurA mit Faktor H Proteinfragmenten inkubiert. PurA band signifikant die Faktor H Fragmente SCRs 1-7, SCRs 8-20 und SCRs 18-20. **F** Immobilisiertes PurA wurde im ELISA zu einen mit Faktor H sowie zum anderen mit Faktor H, welcher mit spezifischen Antikörpern vorinkubiert wurde, inkubiert. Wird eine potentielle Faktor H Binderegion von PurA durch einen Faktor H Antikörper blockiert, so wird die PurA Bindung an Faktor H reduziert. Die Bindung von PurA an Faktor H war signifikant reduziert, wenn Faktor H mit einem Antikörper vorinkubiert wurde, welcher SCR 20 erkennt. Die ermittelten Werte sind normiert auf Faktor H, welches nicht mit einem Antikörper inkubiert wurde. Die Daten zeigen MW und SA aus jeweils drei unabhängigen Versuchen. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

3.1.3 Die Bindung von Ssl11 und PurA an Faktor H ist abhängig von der Ionenstärke

Die Inhibition einer Bindung durch NaCl gibt Aufschluss darüber, ob diese Bindung ionenstärkeabhängig ist. Ssl11 und PurA, beide immobilisiert, wurden mit Faktor H sowie unterschiedlichen Konzentrationen von NaCl (0-1 M) inkubiert.

NaCl beeinflusst die Bindung von Faktor H an immobilisiertes Ssl11 oder PurA. Der Einfluss der Ionenstärke auf die Bindung von Ssl11 und PurA an Faktor H war umso höher, je mehr NaCl vorlag (**Abb. 3.5**). Bei höchster NaCl-Konzentration von 1 M war die Ssl11-Faktor H Bindung um 41 % und die PurA-Faktor H Bindung um 53 % reduziert.

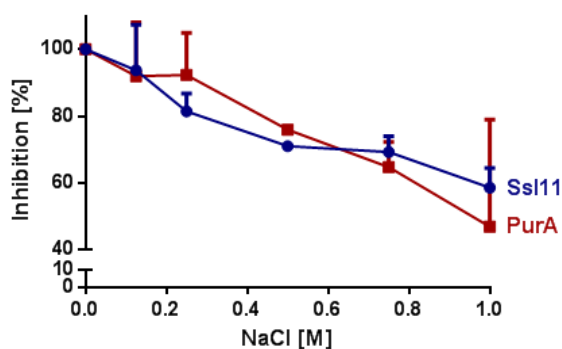


Abbildung 3.5: Die Ionenstärke beeinflusst die Bindung von Ssl11 und PurA an Faktor H. Ionenstärke-abhängige Bindungen können mit NaCl inhibiert werden. Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurden im ELISA mit Faktor H sowie steigenden Konzentrationen von NaCl inkubiert. Bei Zugabe von 1 M NaCl war die Bindung von Ssl11 an Faktor H um 41 % niedriger bzw. im Falle von PurA um 53 % als ohne Zusatz von NaCl. Die Daten zeigen MW und SA aus zwei unabhängigen Versuchen.

3.1.4 PurA bindet Faktor H, FHL-1 und CFHR1

FHL-1 und CFHR1 gehören zur Faktor H-Proteinfamilie. FHL-1 besteht aus den SCRs 1-7 von Faktor H. CFHR1 weist strukturelle Ähnlichkeiten zu den SCRs 6-7 sowie SCRs 18-20 von Faktor H auf (**Abb. 3.6A**) (Jozsi und Zipfel 2008). Daher wurde getestet, ob die mikrobiellen Proteine Ssl11 und PurA auch FHL-1 und CFHR1 binden. Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurde mit den Liganden FHL-1 und CFHR1 im ELISA inkubiert.

Ssl11 hat nicht an FHL-1 gebunden, wohingegen PurA FHL-1 dosisabhängig band (**Abb. 3.6B**). Ssl11 band auch CFHR1 nicht, jedoch hat PurA, neben FHL-1, auch CFHR1 dosisabhängig gebunden (**Abb. 3.6C**).

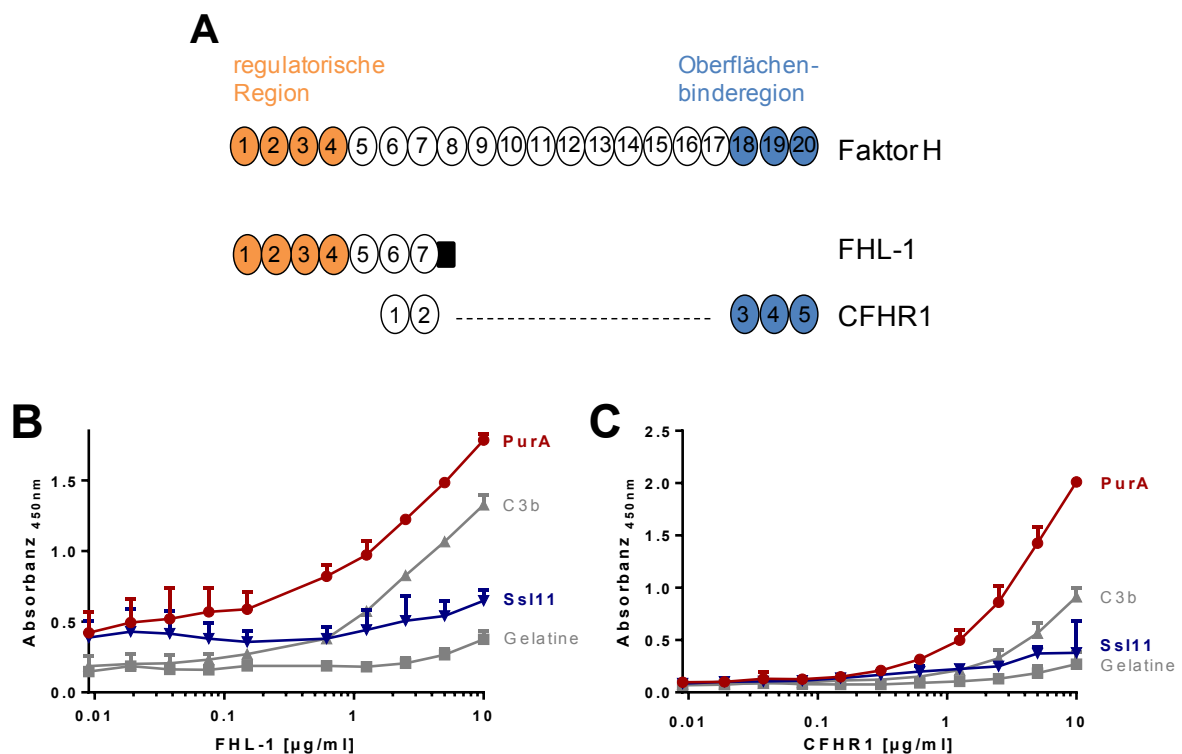


Abbildung 3.6: PurA bindet humanes FHL-1 und CFHR1. Die Bindung von Ssl11 und PurA an FHL-1 sowie CFHR1 wurde im ELISA untersucht. **A** FHL1 und CFHR1 weisen strukturelle Ähnlichkeiten zum Faktor H auf. **B** Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurden mit FHL-1 inkubiert. Während Ssl11 keine Bindung zeigte, band PurA dosisabhängig an FHL-1. Die Daten zeigen MW und SA aus zwei unabhängigen Versuchen. **C** Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurden mit CFHR1 inkubiert. Ssl11 band ebenfalls nicht, wohingegen PurA dosisabhängig CFHR1 band. C3b dient als Positiv-, Gelatine als Negativkontrolle. Die Daten zeigen MW und SA aus drei unabhängigen Versuchen.

3.1.5 Ssl11 reduziert die C3b- und C5b-9 Deposition

Faktor H und FHL-1 sind Regulatoren des alternativen Komplementweges, die durch Ssl11 und PurA gebunden werden. Im Folgenden wurde untersucht, ob Ssl11 und PurA die Aktivierung des alternativen Komplementweges beeinflussen. Die mikrobiellen Proteine Ssl11 und PurA wurden in aufsteigenden Konzentrationen mit 7,5 % NHS inkubiert. Immobilisiertes LPS wurde weiterhin mit dem NHS-inkubiertem Ssl11 bzw. PurA inkubiert.

Die Komplementaktivierung wurde anhand der C3b-Deposition sowie der Ausbildung des C5b-9-Komplexes auf der LPS-Oberfläche detektiert. Ssl11 (6 µg/ml) inhibierte die C3b-Deposition um 24 %, während PurA keinen Effekt hatte (**Abb. 3.7A**). Ssl11 hemmte zudem die Deposition von C5b-9-Komplexen um 60 %. PurA beeinflusste die Ausbildung von C5b-9-Komplexen nicht (**Abb. 3.7B**). Die Intensität des inhibitorischen Effektes von Ssl11 ist mit dem des Gpd2 vergleichbar.

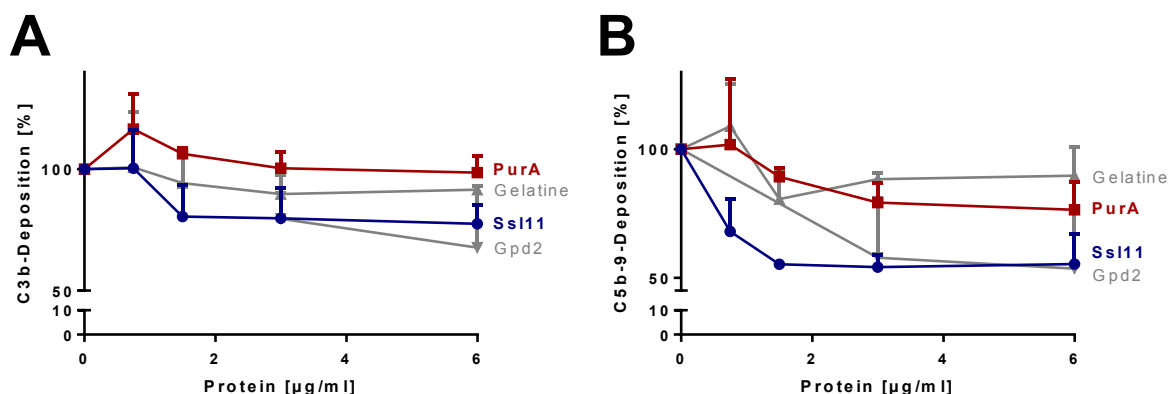


Abbildung 3.7: Ssl11 reduziert die C3b und C5b-9-Deposition. Es wurde geprüft, ob Ssl11 und PurA aufgrund ihrer Fähigkeit, Faktor H zu binden, den alternativen Weg inhibieren können. Steigende Konzentrationen von Ssl11 und PurA wurden mit NHS inkubiert. Das mit mikrobiellen Proteinen vorinkubierte Serum wurde weiterhin mit immobilisiertem LPS aktiviert. Ssl11 inhibierte die C3b-Deposition um 24 % und C5b-9-Deposition um 60 %, während PurA nur einen geringen Effekt (76 %), ähnlich dem der Negativkontrolle Gelatine (89 %), auf die C5b-9-Deposition aufwies. Gpd2 ist ein bekannter Inhibitor des alternativen Weges (Luo et al. 2013). Die Daten zeigen MW und SA aus drei unabhängigen Versuchen.

3.1.6 Rekrutiertes Faktor H und FHL-1 fungieren als Kofaktor für die Protease Faktor I

S. aureus nutzt die Rekrutierung von als Kofaktor-fungierendem Faktor H bzw. FHL-1 zur Komplementevasion. Es wurde analysiert, ob Ssl11-gebundener Faktor H bzw. PurA-gebundener Faktor H und FHL-1 ihre funktionelle Aktivität beibehalten. Die immobilisierten Proteine Ssl11 und PurA wurden mit Faktor H bzw. FHL-1 inkubiert. Anschließend wurden C3b und Faktor I hinzugegeben und der C3b-Abbau zeitabhängig analysiert.

An Ssl11 gebundener Faktor H war aktiver Kofaktor für die Protease Faktor I. Im Immunoblot wurde zeitabhängig die Faktor I-Spaltung der α' -Kette des C3b in Spaltprodukte mit einem Molekulargewicht von 68 kDa und 41 kDa detektiert (**Abb. 3.8B**, Spuren 2-5). An PurA gebundener Faktor H war ebenfalls funktionell aktiv. Nach 2 h bzw. 3 h Inkubation mit C3b und Faktor I wurde die α' -Kette des C3b durch die Protease Faktor I in deren Produkte von 68 kDa und 41 kDa gespalten (**Abb. 3.8C**, Spuren 4-5). PurA-gebundenes FHL-1 fungierte in der C3b-Spaltung ebenfalls als Kofaktor für Faktor I. Es erfolgte eine zeitabhängige Fragmentierung der α' -Kette des C3b in deren 68 kDa und 41 kDa große Spaltprodukte (**Abb. 3.8D**, Spuren 2-5).

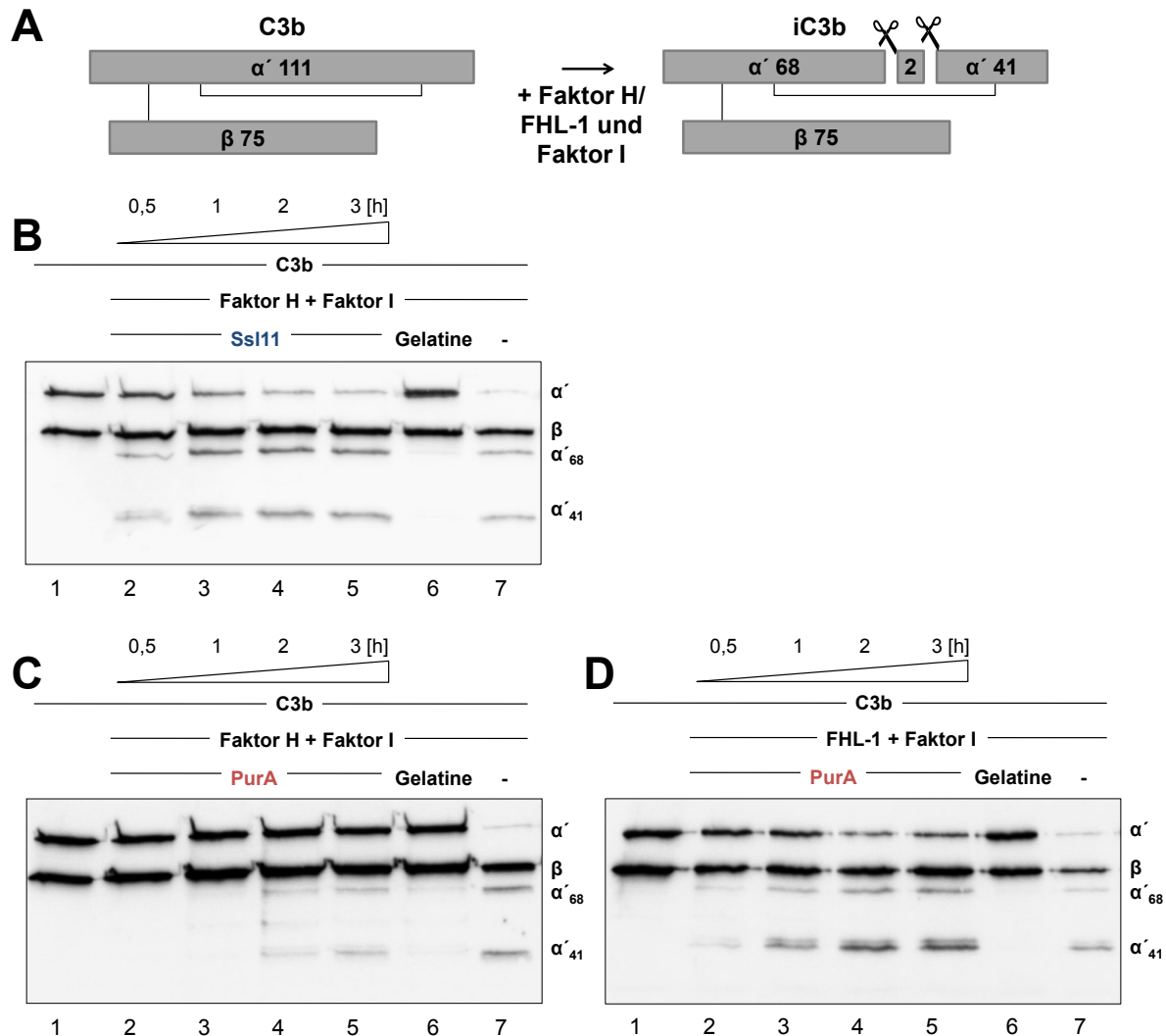


Abbildung 3.8: Faktor H und FHL-1, gebunden an Ssl11 und PurA agieren als Kofaktor für die Protease Faktor I. **A** Die α'-Kette des C3b wird zur Inaktivierung des Proteins von der Serinprotease Faktor I, im Beisein von Faktor H, in Fragmente mit einem Molekulargewicht von 68 kDa, 43 kDa und 41 kDa gespalten. **B** Es wurde analysiert, ob Faktor H, gebunden durch Ssl11 die Faktor I-Spaltung von C3b unterstützt. Immobilisiertes Ssl11 wurde mit Faktor H inkubiert. C3b und Faktor I wurden hinzugefügt und der C3b-Abbau zu den Zeitpunkten 0,5 h, 1 h, 2 h und 3 h untersucht. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE separiert und via Immunoblotting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Faktor H, welches durch Ssl11 rekrutiert wurde, fungierte als Kofaktor für die Protease Faktor I und unterstützte die Spaltung von C3b in iC3b. **C** Immobilisiertes PurA wurde mit Faktor H inkubiert. C3b und Faktor I wurden zugefügt und der C3b-Abbau nach 0,5 h, 1 h, 2 h und 3 h detektiert. Faktor H, welches von PurA gebunden wurde, diente als Kofaktor für Faktor I. Faktor H, Faktor I und C3b in Flüssigphase, welche für 1 h inkubiert wurden (jeweils Spur 7) dienten als Positivkontrolle und die Bindung von Faktor H an Gelatine als Negativkontrolle (jeweils Spur 6). **D** PurA band zudem FHL-1, welches ebenfalls Kofaktoraktivität für Faktor I aufweist. Immobilisiertes PurA wurde mit FHL-1 inkubiert. C3b und Faktor I wurden zugegeben. Die Probenahmen zur Detektion des C3b-Abbaus erfolgten nach 0,5 h, 1 h, 2 h und 3 h. FHL-1, gebunden an PurA diente als Kofaktor für Faktor I und unterstützte die Spaltung von C3b. Als Positivkontrolle diente eine Inkubation von FHL-1, Faktor I und C3b für 1 h in Flüssigphase. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

3.2 Rekrutierung von Plasminogen durch Ssl11 und PurA

3.2.1 Ssl11 und PurA binden Plasminogen

Durch die Bindung des Komplementregulators Plasminogen umgeht *S. aureus* die humane Immunantwort. Es ist sehr wahrscheinlich, dass *S. aureus* neben den bisher bekannten, weitere unbekannte Proteine exprimiert, die das abundante Plasmaprotein Plasminogen an die mikrobielle Oberfläche rekrutieren. Die Bindung von Staphylokokkenproteinen an Plasminogen wurde untersucht. Die auf dem Proteinarray immobilisierten Staphylokokkenproteine wurden mit dem Ligand Plasminogen inkubiert.

Ssl11 wurde erstmals als Plasminogen bindendes Protein identifiziert. Der C-terminale Teil des Efb (EfbC) sowie der C-terminale Teil des Sbi (Sbi3-4) banden ebenfalls Plasminogen, wohingegen Ssl7 kein Plasminogen gebunden hat (**Abb. 3.9**). Das Protein PurA lag auf dem verwendeten Proteinarray nicht in einer Konzentration vor, die der Sättigung entsprach, sodass bezüglich der Plasminogenbindung keine valide Aussage getroffen werden konnte.

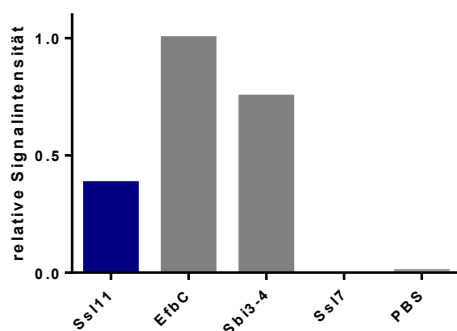
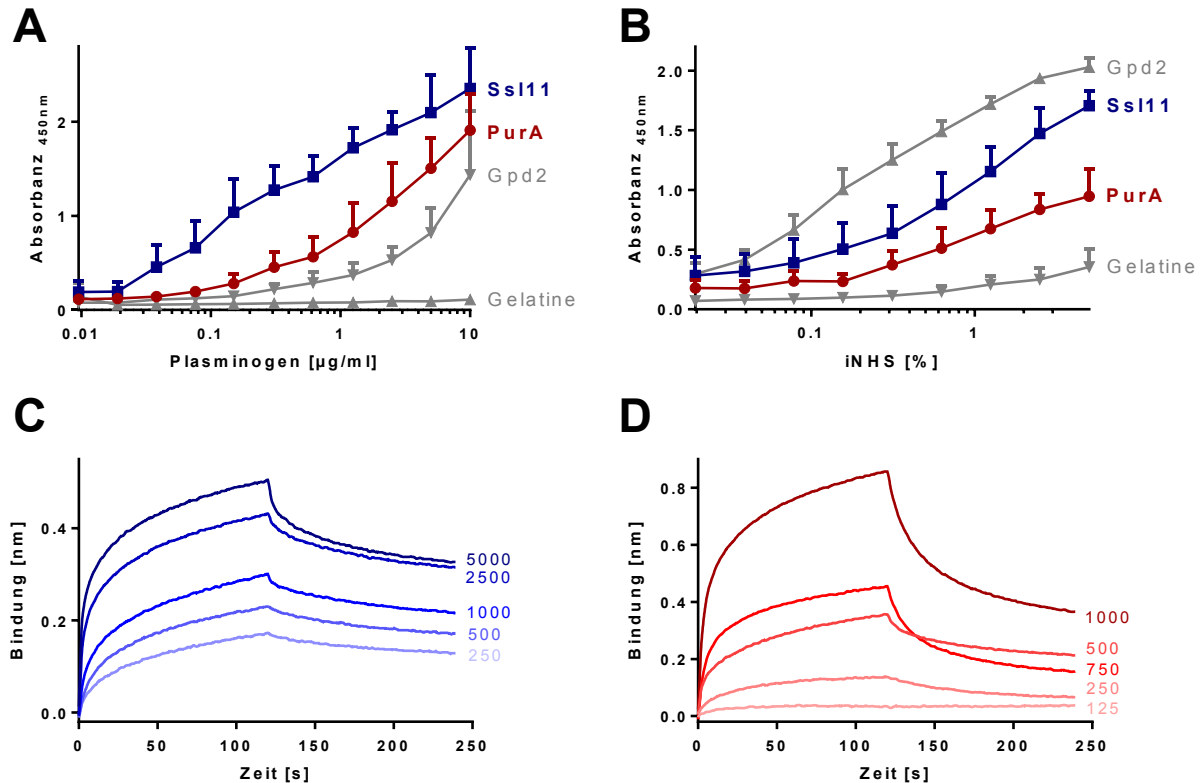


Abbildung 3.9: Ssl11 bindet Plasminogen. Im Proteinarray wurde untersucht, ob die gespotteten *S. aureus* Proteine an den Komplementregulator Plasminogen binden. Ssl11 band Plasminogen im Proteinarray und ist somit ein neu identifiziertes Plasminogen-bindendes *S. aureus*-Protein. EfbC und Sbi3-4 als bekannte Plasminogen-bindende Proteine dienten als Positivkontrolle. Ssl7 und PBS banden Plasminogen nicht. Die Signalintensitäten aller Proteine wurden auf EfbC normiert.

Die Bindung von Ssl11 und PurA an Plasminogen sowie die Dosisabhängigkeit dieser Interaktion wurde im ELISA untersucht. Ssl11 und PurA banden sowohl gereinigtes Plasminogen, als auch Plasminogen aus iNHS. Die Bindungen waren jeweils konzentrationsabhängig (**Abb. 3.10A, Abb. 3.10B**).

Durch Biolayer Interferometrie wurden die Assoziationsrate, die Dissoziationsrate sowie die Bindeaffinität (K_D) bestimmt. Ssl11 hat mit einer Affinität von 133,6 nM an

Plasminogen gebunden. PurA band Plasminogen mit einer Affinität von 252,7 nM. Pro Sekunde assoziierten 27900 Ssl11-Plasminogen-Komplexe und etwa doppelt so viele, insgesamt 62600 PurA-Plasminogen-Komplexe (**Abb. 3.10C**, **Abb. 3.10D**).



	Ssl11	PurA
K_D (nM)	133,6	252,7
k_a (1/Ms)	27900	62600
k_d (1/s)	0,00373	0,0158

Abbildung 3.10: Ssl11 und PurA binden Plasminogen. Die Bindung von Ssl11 und PurA an Plasminogen wurde im ELISA untersucht. **A** Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurden mit Plasminogen (0,01-10 µg/ml) inkubiert. Ssl11 sowie PurA banden Plasminogen dosisabhängig. **B** Die immobilisierten Proteine Ssl11 und PurA wurden mit iNHS (0,02-5 %) inkubiert. Ssl11 und PurA banden dosisabhängig Plasminogen aus inaktiviertem Serum. Gelatine diente als Negativkontrolle und Gpd2, ein *C. albicans*-Protein, stellte die Positivkontrolle dar. Die Daten zeigen MW und SA aus drei unabhängigen Versuchen. **C** Die Bindungsaffinitäten von Ssl11 und PurA zu Plasminogen wurden mittels Bi-layer Interferometrie analysiert. Zuvor biotinyliertes Ssl11 (Ssl11*) wurde auf einen Streptavidin-Sensor beladen und mit indizierten Mengen Plasminogen (nM) inkubiert. Ssl11* band dosisabhängig Plasminogen. Aus den Einzelmessungen ergab sich eine Bindeaffinität von 133,6 nM von Ssl11 an Plasminogen. **D** His-getaggttes PurA wurde auf einen Ni-NTA Sensor beladen und die indizierte Menge Plasminogen (nM) zugegeben. PurA band Plasminogen ebenfalls dosisabhängig. Aus den Einzelmessungen ergab sich für die Bindung von PurA an Plasminogen eine Affinität von 252,7 nM. Gezeigt sind die repräsentativen Diagramme aus jeweils drei unabhängigen Interferometrie-Versuchen. K_D = Dissoziationskonstante, k_a = Assoziationsrate, k_d = Dissoziationsrate.

3.2.2 Die mit ϵ ACA-inhibierbare Bindung von Ssl11 und PurA an Plasminogen ist abhängig von der Ionenstärke

Die Lysin-Bindestellen von Plasminogen sind wichtig für die Regulation der Fibrinolyse durch das aktive Plasmin. Um zu untersuchen, ob Ssl11 und PurA Plasminogen über dessen Lysine binden, wurde ϵ ACA in einem ELISA als inhibierendes Agens hinzugefügt. Dabei handelt es sich um einen Lysin-ähnlichen Ligand. Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurden mit Plasminogen und ϵ ACA inkubiert.

Die Bindung von Ssl11 an Plasminogen wurde durch ϵ ACA nahezu vollständig inhibiert. PurA band in Anwesenheit von ϵ ACA ebenfalls nicht mehr an Plasminogen (**Abb. 3.11A**).

Zudem wurde der Einfluss von NaCl auf die Bindung von Ssl11 und PurA an Plasminogen im ELISA untersucht, was Aufschluss über die Abhängigkeit der Bindung von der Ionenstärke gibt. Dafür wurden Ssl11 und PurA immobilisiert und mit Plasminogen sowie den indizierten Konzentrationen von NaCl (0-1 M) inkubiert.

Ssl11 und PurA banden umso weniger Plasminogen, je mehr NaCl vorlag (**Abb. 3.11B**). Bei höchster Konzentration von 1 M reduzierte NaCl die Ssl11-Plasminogen-Bindung um 39 % sowie die PurA-Plasminogen-Bindung um nahezu das Doppelte, um 70 %.

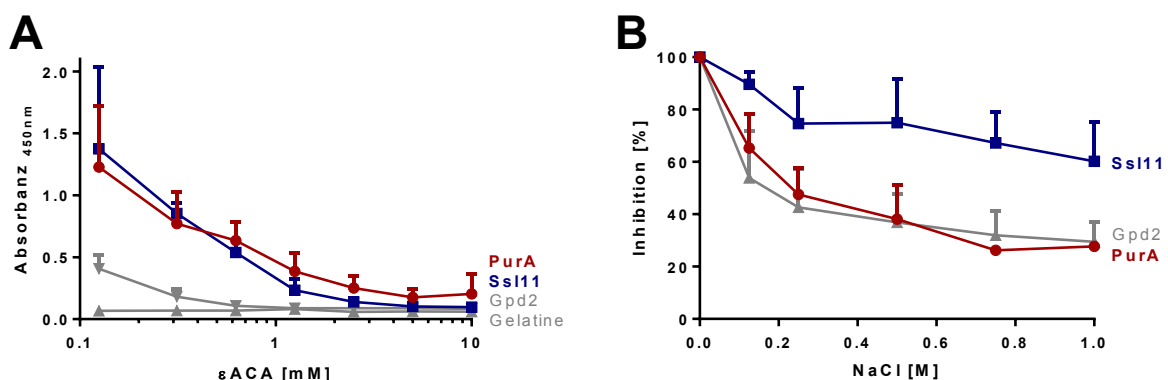


Abbildung 3.11: ϵ ACA und NaCl beeinflussen die Bindung von Ssl11 und PurA an Plasminogen. Zur weiteren Charakterisierung der Plasminogenbindung wurden ELISA-Studien durchgeführt. **A** Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurde mit Plasminogen inkubiert, welches mit ϵ ACA, einem Lysin-ähnlichen Ligand, vorinkubiert wurde. ϵ ACA inhibierte die Bindung von Ssl11 und PurA an Plasminogen. Gpd2 diente als Positivkontrolle, Gelatine als Negativkontrolle. **B** Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurden im ELISA mit Plasminogen sowie steigenden Konzentrationen von NaCl inkubiert. NaCl reduzierte die Bindung von Plasminogen und Ssl11 um 39 %, während bei PurA, ähnlich wie Gpd2, der Positivkontrolle, eine Inhibition von etwa 70 % vorlag. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Bindung der Proteine zu Plasminogen ohne Zugabe von NaCl. Die Daten zeigen MW und SA aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2.3 Der Aktivator uPa spaltet Plasminogen, das an Ssl11 und PurA gebunden ist, zu aktivem Plasmin

Nachfolgend wurde untersucht, ob die Rekrutierung von Plasminogen durch Ssl11 bzw. PurA zur Evasion des Immunsystems beiträgt. Dafür wurde ermittelt, ob durch Ssl11 und PurA gebundenes Plasminogen durch den humanen Aktivator uPa zu aktivem Plasmin gespalten wird. Die immobilisierten mikrobiellen Proteine wurden mit Plasminogen und im weiteren Verlauf mit uPa und dem chromogenen Substrat S-2251 inkubiert. Die Spaltung des S-2251 durch Plasmin wurde über 24 h detektiert.

Ssl11-gebundenes Plasminogen wurde zeitabhängig durch uPa zu Plasmin aktiviert. Plasmin im Komplex mit Ssl11 spaltet S-2251 annähernd so schnell wie Plasmin, welches an kein mikrobielles Protein gebunden ist. Plasminogen, gebunden an PurA, wurde ebenfalls zu Plasmin aktiviert und spaltete zeitabhängig S-2251, jedoch in geringerem Maß als Ssl11-gebundenes Plasmin(ogen) (**Abb. 3.12A**). Dies wurde zusätzlich durch die Bestimmung der Halbwertszeiten von S-2251 bestätigt. Dabei handelt es sich um den Zeitpunkt innerhalb der 24 h-Messung, an dem die Hälfte des Substrats S-2251 umgesetzt war. Während Ssl11-gebundenes Plasmin(ogen) S-2251 bereits nach 3 h zur Hälfte umgesetzt hatte, hatte PurA-gebundenes Plasmin(ogen) dies nach 9 h erreicht. Die Halbwertszeit des Substrats S-2251 betrug 2 h im Falle von ungebundenem Plasmin(ogen) (**Abb. 3.12B**).

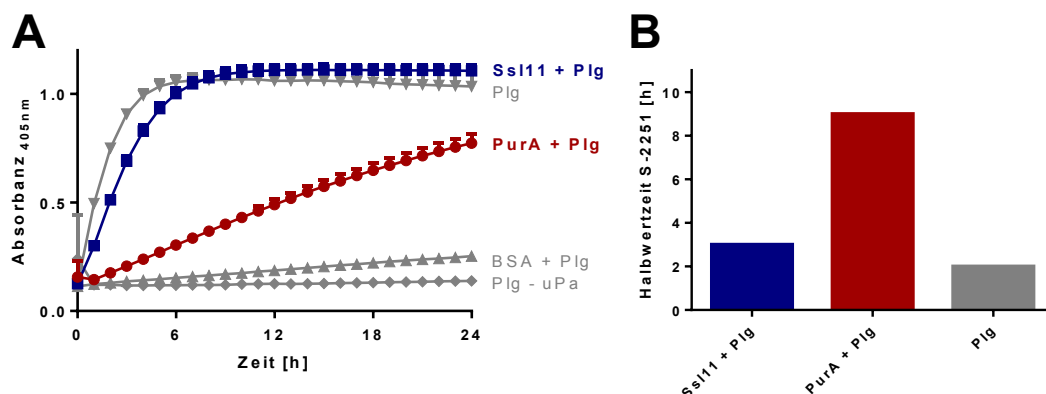


Abbildung 3.12: Plasminogen, welches an Ssl11 und PurA gebunden ist, wird durch uPa zu Plasmin konvertiert. Um die funktionelle Relevanz der Plasminogenbindung durch Ssl11 und PurA zu analysieren, wurde die Spaltung des chromogenen Plasminsubstrats S-2251 untersucht. **A** Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurde mit Plasminogen inkubiert. Nach einem Waschschritt wurden das Substrat S-2251 und der Plasminogenaktivator uPa zugefügt. Die Umsetzung des Substrats durch aktiviertes Plasmin wurde über 24 h detektiert. Immobilisiertes Plasminogen diente als Positivkontrolle, Plasminogen gebunden an BSA und Plasminogen ohne uPa als Negativkontrolle. An Ssl11 und PurA gebundenes Plasminogen wurde durch uPa zu Plasmin gespalten, welches das Substrat S-2251 zeitabhängig spaltete. **B** Die halbmaximale Aktivität von Ssl11 gebundenem Plasmin(ogen) wurde nach 3 h, für PurA gebundenes Plasmin(ogen) nach 9 h und für Plasmin(ogen) allein nach 2h erreicht. Gezeigt ist eine repräsentative Dreifachmessung aus drei unabhängigen Versuchen.

Neben der Spaltung des artifiziellen S-2251 wurde die Spaltung des nativen Liganden Fibrinogen und des Komplementproteins C3b nach Aktivierung von durch Ssl11 oder PurA gebundenem Plasmin untersucht. Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurden mit Plasminogen inkubiert. Weiterhin wurden der Aktivator uPa sowie Fibrinogen oder C3b zugefügt und der Abbau der zwei Liganden zeitabhängig mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot detektiert.

An Ssl11 gebundenes Plasmin(ogen) spaltete das Plasmaprotein Fibrinogen. Die Aktivität des Plasmin(ogen)s wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h und 4 h untersucht. Bereits nach 0,5 h war die Fibrinogenmenge reduziert (Spur 2) und nach 1 h (Spur 3) wurde das gesamte Fibrinogen durch Ssl11-gebundenes Plasmin(ogen) zersetzt (**Abb. 3.13A**). Auch an PurA gebundenes Plasmin(ogen) spaltete Fibrinogen. Der Abbau wurde über einen Zeitraum von 20 h detektiert. Nach 4 h (Spur 5) kam es zu einer sichtbaren Reduktion des Fibrinogens und nach 20 h (Spur 6) war Fibrinogen vollständig durch Plasmin(ogen) im Komplex mit PurA abgebaut (**Abb. 3.13B**).

C3b wurde ebenfalls durch Ssl11-gebundenes Plasmin(ogen) gespalten. Der Abbau wurde nach 0,5 h-20 h geprüft. Nach 2 h wurde C3b durch Plasmin(ogen) bereits in ein C3b-Spaltprodukt mit einem Molekulargewicht von 43 kDa (Spur 4) umgesetzt. Nach 4 h (Spur 5) entstanden Spaltprodukte mit einem Molekulargewicht von 68 kDa und 43 kDa und nach 20 h (Spur 6) konnte zusätzlich noch ein weiteres Produkt von 41 kDa nachgewiesen werden (**Abb. 3.13C**). Von PurA-gebundenem Plasmin(ogen) wurde ebenfalls die Fähigkeit, C3b zu spalten, untersucht. Über den gesamten Zeitraum von 20 h wurde keine C3b-Spaltung von PurA-gebundenem Plasmin(ogen) nachgewiesen (**Abb. 3.13D**).

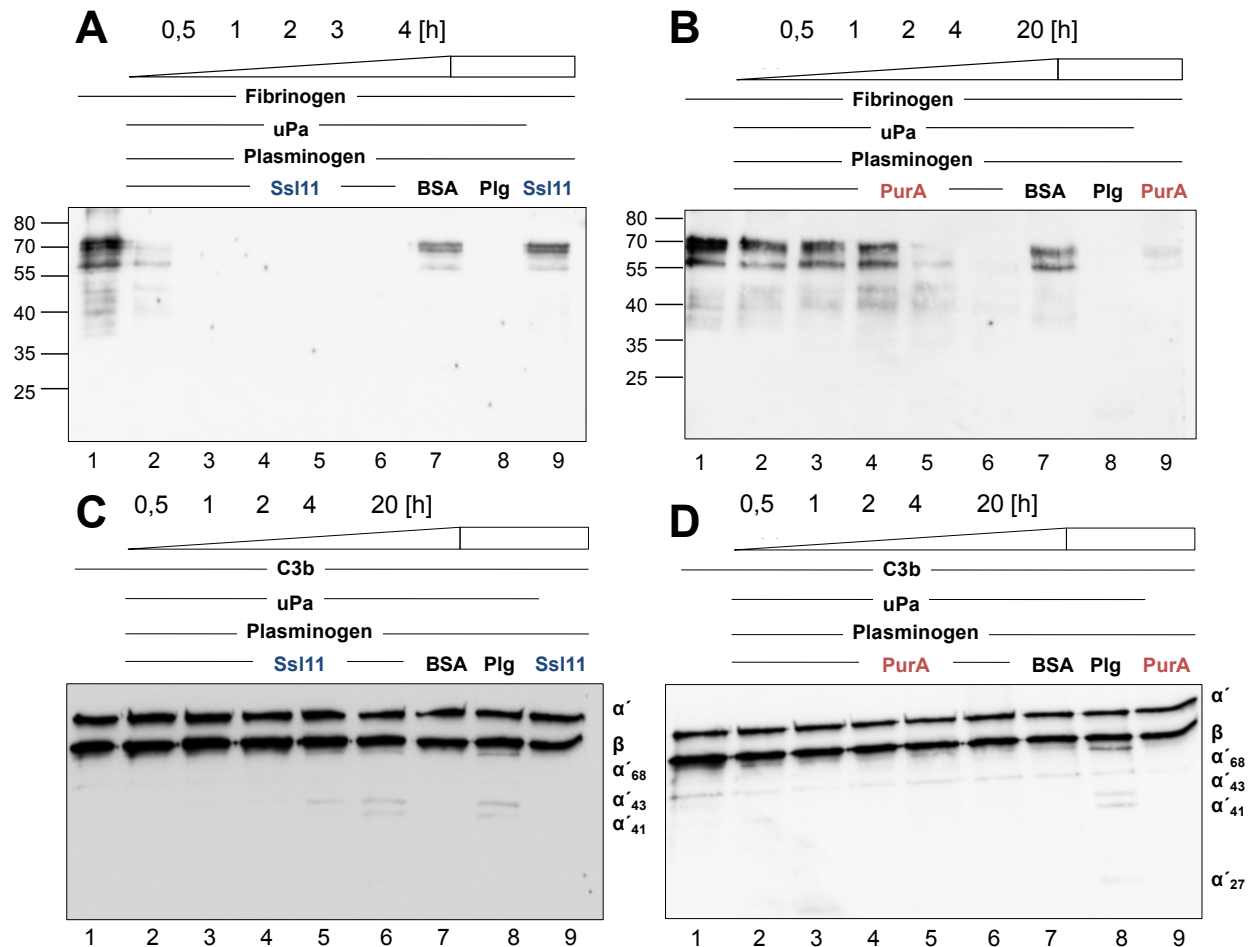


Abbildung 3.13: Durch Ssl11 und PurA gebundenes Plasmin(ogen) spaltet Fibrinogen und das Komplementprotein C3b. Plasminogen weist ein vielseitiges Spektrum an Liganden auf. Die Spaltung von Fibrinogen sowie C3b durch Plasmin(ogen), welches an Ssl11 bzw. PurA gebunden ist, wurde untersucht. Das humane uPa aktivierte Plasminogen zur aktiven Protease Plasmin. **A** Immobilisiertes Ssl11 wurde mit Plasminogen inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Zugabe von uPa und Fibrinogen. Der Abbau von Fibrinogen wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h und 4 h detektiert. Via SDS-PAGE wurden die Spaltprodukte separiert und anschließend mittels Immunoblotting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Durch Ssl11 gebundenes Plasminogen wurde zu Plasmin aktiviert und spaltete Fibrinogen zeitabhängig. **B** Immobilisiertes PurA wurde mit Plasminogen inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von uPa und Fibrinogen. Der Abbau von Fibrinogen wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h und 20 h detektiert. Plasminogen, das von PurA gebunden wurde, wurde zu Plasmin aktiviert und spaltete zeitabhängig Fibrinogen. **C** Immobilisiertes Ssl11 wurde erneut mit Plasminogen inkubiert. Die Zugabe von uPa und C3b erfolgte nach einem Waschschrift. Der Abbau von C3b wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h und 20 h analysiert. Durch Ssl11 gebundenes Plasminogen wurde zu Plasmin aktiviert und spaltete zeitabhängig C3b. **D** Immobilisiertes PurA wurde mit Plasminogen inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von uPa und C3b. Der Abbau von C3b wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h und 20 h detektiert. Es konnte keine Spaltung von C3b durch Plasmin(ogen), das von PurA gebunden wurde, detektiert werden. Immobilisiertes Plasminogen diente jeweils als Positivkontrolle (jeweils Spur 8), wohingegen BSA gebundenes Plasminogen (je Spur 7) sowie die Abwesenheit des Aktivators uPa (je Spur 9) Negativkontrollen darstellten. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für jeweils drei unabhängige Versuche.

3.2.4 Die Staphylokinase aktiviert Plasminogen, das an Ssl11 und PurA gebunden ist

Das *S. aureus* Protein Staphylokinase (SAK) aktiviert ebenfalls Plasminogen zu Plasmin (Mölkänen et al. 2002). Im Folgenden wurde analysiert, ob durch SAK aktiviertes Plasmin, wie uPa auch, das chromogene Substrat S-2251 spalten kann. In der Konsequenz wäre *S. aureus* in der Lage, ohne die Anwesenheit eines humanen Aktivators Plasminogen zu rekrutieren und zu aktivieren. Die immobilisierten Proteine Ssl11 und PurA wurden mit Plasminogen inkubiert. Der Aktivator SAK sowie S-2251 wurden hinzugefügt und die Spaltung des chromogenen Substrats S-2251 durch Plasmin über 24 h detektiert.

Durch Ssl11 gebundenes Plasminogen wurde zeitabhängig durch die SAK zu Plasmin aktiviert und spaltet S-2251 ebenso schnell wie Plasmin(ogen), welches an kein mikrobielles Protein gebunden war. Plasminogen, das an PurA gebunden war, wurde ebenfalls zu Plasmin aktiviert und setzte S-2251 zeitabhängig um (**Abb. 3.14A**). Die Halbwertszeiten von S-2251 geben Aufschluss darüber, wie schnell mikrobiell gebundenes Plasminogen aktiviert wurde. Während Ssl11 gebundenes Plasmin(ogen) S-2251 bereits nach 3 h zur Hälfte umgesetzt hatte, hatte PurA gebundenes Plasmin(ogen) dies nach 9-10 h erreicht. Für Plasmin(ogen), das an kein mikrobielles Protein gebunden war, betrug die Halbwertszeit des Substrats 2-3 h (**Abb. 3.14B**).

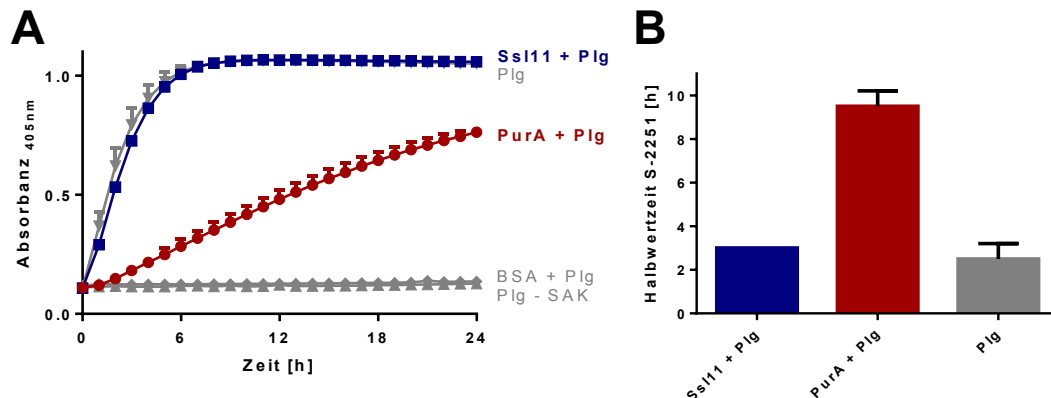


Abbildung 3.14: Die Staphylokinase aktiviert an Ssl11 und PurA gebundenes Plasminogen. Die SAK ist ein von *S. aureus* sekretiertes Protein, welches, genau wie uPa, Plasminogen aktiviert. Die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin und somit die Spaltung des chromogenen Plasminsubstrats S-2251 wurde analysiert. **A** Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurden mit Plasminogen inkubiert. Nach einem Waschschritt wurden das Substrat S-2251 und der mikrobielle Plasminogenaktivator SAK zugefügt. Die Umsetzung des Substrats wurde über 24 h detektiert. Immobilisiertes Plasminogen diente als Positivkontrolle, Plasminogen gebunden an BSA und Plasminogen ohne uPa als Negativkontrolle. An Ssl11 und PurA gebundenes Plasminogen wurde durch SAK in Plasmin umgewandelt, welches das Substrat S-2251 zeitabhängig spaltete. **B** Ssl11 gebundenes Plasmin(ogen) hatte nach 3 h die Hälfte des S-2251 zersetzt, PurA gebundenes Plasmin(ogen) nach 9-10 h und Plasmin(ogen) allein nach 2-3 h. Gezeigt ist eine repräsentative Dreifachmessung aus zwei unabhängigen Versuchen.

Plasmin(ogen), im Komplex mit Ssl11 oder PurA, spaltet effizient Fibrinogen und C3b, wenn es mit uPa aktiviert wird (**Abb. 3.13**). Weiterhin wurde die Spaltung der nativen Liganden Fibrinogen und C3b durch SAK aktiviertes und Ssl11 bzw. PurA rekrutiertes Plasmin(ogen) untersucht. Dies stellt eine Strategie zur Immun- und Komplementevasion von *S. aureus* dar. Immobilisiertes Ssl11 und PurA wurden dazu mit Plasminogen inkubiert. Weiterhin wurde der Aktivator SAK sowie Fibrinogen oder C3b zugefügt und die Spaltung der zwei Liganden zeitabhängig mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot detektiert.

An Ssl11 gebundenes Plasmin(ogen) spaltete das Plasmaprotein Fibrinogen. Über einen Zeitraum von 4 h wurde die Aktivität des Plasmin(ogen) untersucht. Bereits nach 0,5 h (Spur 2) war die Fibrinogenmenge reduziert und nach 2 h (Spur 4) war das gesamte Fibrinogen zersetzt (**Abb. 3.15A**). Auch an PurA gebundenes Plasmin(ogen) spaltete Fibrinogen. Die Spaltung wurde nach 0,5 h-20 h detektiert. Nach 0,5 h (Spur 2) war Fibrinogen bereits sichtbar reduziert und nach 20 h (Spur 6) war Fibrinogen vollständig durch Plasmin(ogen) gespalten (**Abb. 3.15B**).

C3b wurde ebenfalls durch Ssl11-gebundenes Plasmin(ogen) zersetzt. Der Abbau wurde über 20 h analysiert. Bereits nach 0,5 h (Spur 2) wurde ein C3b-Produkt von 68 kDa gespalten und nach 20 h (Spur 6) war C3b in Produkte mit Molekular-

gewichten von 68 kDa, 43 kDa, 41 kDa sowie 27 kDa gespalten (**Abb. 3.15C**). PurA-gebundenes Plasmin(ogen) zersetzte lediglich eine geringe Menge des C3b. Nachdem der Abbau über 20 h detektiert wurde, war C3b nach 20 h (Spur 6) in Moleküle von 68 und 43 kDa Molekulargewicht gespalten (**Abb. 3.15D**).

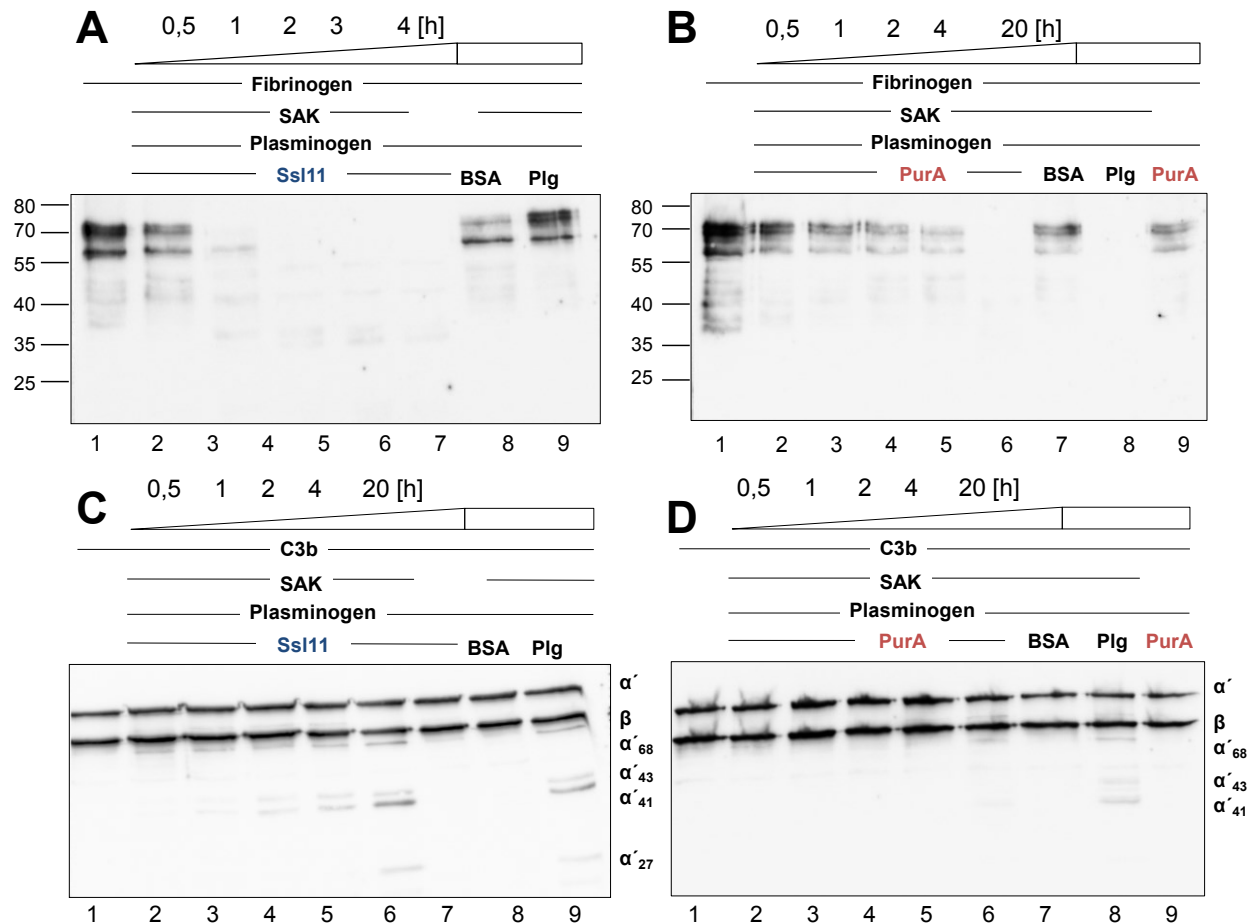


Abbildung 3.15: Die mikrobielle Expression der SAK unterstützt die Spaltung von Fibrinogen und C3b durch Plasmin(ogen). Die Spaltung von Fibrinogen sowie C3b durch Plasmin(ogen), welches an Ssl11 und PurA gebunden ist, wurde untersucht. Die mikrobielle SAK aktiviert Plasminogen zur aktiven Protease Plasmin. **A** Immobilisiertes Ssl11 wurde mit Plasminogen inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Zugabe von SAK und Fibrinogen. Der Abbau von Fibrinogen wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h und 4 h detektiert. Via SDS-PAGE wurden die Spaltprodukte separiert und anschließend mittels Immunoblotting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Durch Ssl11 gebundenes Plasminogen wurde zu Plasmin aktiviert und spaltete Fibrinogen zeitabhängig. **B** Immobilisiertes PurA wurde mit Plasminogen inkubiert. SAK und Fibrinogen wurden zugegeben. Der Abbau von Fibrinogen wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h und 20 h detektiert. Plasminogen, das von PurA gebunden wurde, wurde mittels SAK zu Plasmin aktiviert und spaltete zeitabhängig Fibrinogen. **C** Immobilisiertes Ssl11 wurde erneut mit Plasminogen inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden SAK und C3b zugegeben. Der Abbau von C3b wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h und 20 h analysiert. Durch Ssl11 gebundenes Plasminogen wurde zu Plasmin aktiviert und spaltete zeitabhängig C3b. **D** PurA wurde erneut mit Plasminogen inkubiert. SAK und C3b wurden hinzugefügt. Der Abbau von C3b wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h und 20 h detektiert. Durch PurA gebundenes Plasminogen wurde zu Plasmin aktiviert und spaltete zeitabhängig C3b. Immobilisiertes Plasminogen diente jeweils als Positivkontrolle (A, C Spur 9; B, D Spur 8), wohingegen durch BSA gebundenes Plasminogen (A, C Spur 8; B, D Spur 7) sowie die Abwesenheit des Aktivators uPa (A, C Spur 7; B, D Spur 9) Negativkontrollen darstellen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für jeweils drei unabhängige Versuche.

3.3 Ssl11 inhibiert Komplement

Das *S. aureus* Protein Ssl11 bindet - im Vergleich zu PurA - Faktor H mit 36-fach höherer Affinität. Ssl11 reduziert die Komplementaktivierung über den alternativen Weg in humanem Serum, während PurA, trotz Bindung an Faktor H und FHL-1 keinen inhibierenden Effekt aufweist. Die Kofaktoraktivität von durch Ssl11-gebundenem Faktor H ist stärker als bei PurA-gebundenem (**Kap. 3.1**).

Die Affinität von Plasminogen zu Ssl11 ist etwa 1,9-fach höher als zu PurA. Durch Ssl11- und PurA-gebundenes Plasminogen wird via uPa oder SAK zu Plasmin aktiviert und spaltet das chromogene Substrat S-2251, Fibrinogen und zumeist auch C3b. Dabei wies das durch Ssl11 rekrutierte Plasmin(ogen) jeweils eine höhere Aktivität auf (**Kap. 3.2**).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die komplementinhibierenden Eigenschaften des Proteins Ssl11 weitergehend untersucht.

3.3.1 Ssl11 rekrutiert parallel Faktor H und Plasminogen

Das *S. aureus* Protein Ssl11 bindet sowohl Faktor H als auch Plasminogen. Es war unklar, welche Region in Ssl11 für die Bindung von Faktor H sowie Plasminogen ursächlich ist. Um zu untersuchen, ob es für beide humane Regulatoren eine gemeinsame Binderegion oder zwei unabhängige Regionen gibt, wurde ein Kompetitionsassay durchgeführt. Immobilisiertes Ssl11 wurde mit konstanten Mengen Faktor H und steigenden Mengen Plasminogen oder umgekehrt im ELISA inkubiert.

Bei konstanter Faktor H-Konzentration band Ssl11 Plasminogen konzentrationsabhängig (**Abb. 3.16A**). Ssl11 bindet Faktor H bei konstanter Plasminogenmenge ebenfalls konzentrationsabhängig (**Abb. 3.16B**).

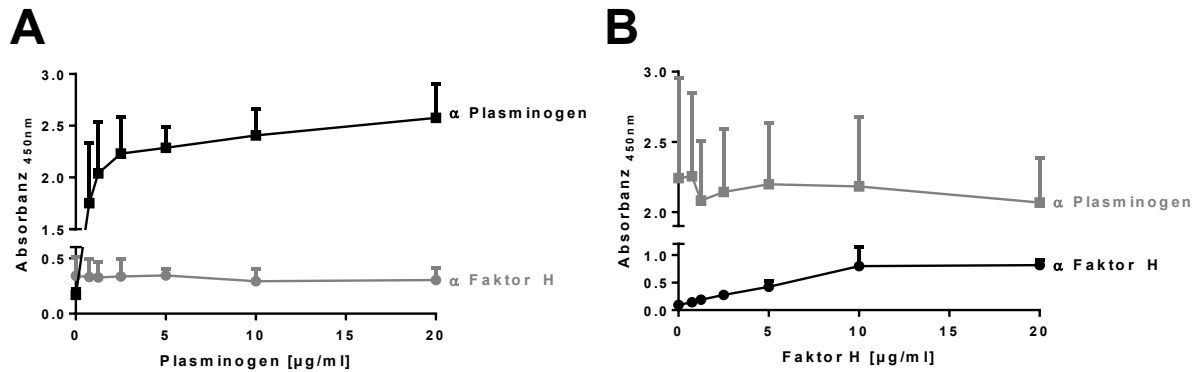


Abbildung 3.16: Ssl11 bindet zeitgleich Faktor H und Plasminogen. Ssl11 bindet die Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen. Ob beide Proteine zeitgleich mit Ssl11 interagieren, wurde in einem Kompetitions-ELISA untersucht. **A** Immobilisiertes Ssl11 wurde mit steigenden Konzentrationen von Plasminogen bei gleichen Faktor H-Mengen inkubiert. Ssl11 band Plasminogen auch in Anwesenheit von Faktor H dosisabhängig. **B** Immobilisiertes Ssl11 wurde mit steigenden Konzentrationen Faktor H bei gleichen Mengen Plasminogen inkubiert. Die Faktor H Bindung von Ssl11 konnte dosisabhängig gezeigt werden, wenn Plasminogen ebenfalls als Ligand vorlag. Die gezeigten Daten zeigen MW und SA von drei unabhängigen Versuchen.

3.3.2 Ssl11 ist auf der Oberfläche von *S. aureus* lokalisiert

Ssl11 ist ein sekretiertes Protein. Es wurde zudem auch auf der Oberfläche von *S. aureus* nachgewiesen (Laughton et al. 2006). Um zu bestätigen, dass Ssl11 oberflächenassoziiert vorliegt und somit die Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen an die mikrobielle Oberfläche rekrutiert, wurde die Lokalisierung des Ssl11 untersucht.

Hierfür wurden *S. aureus*-Mutanten generiert, welche spezifische Proteine nicht mehr exprimieren: das *S. aureus*-Protein Spa bindet Immunglobuline (Cedergren et al. 1993). Für Untersuchungen, welche Antikörper zur Detektion verwenden, ist dies sehr hinderlich, da unspezifische Signale generiert werden. Aus diesem Grund diente ein *S. aureus*-Stamm, welcher Spa nicht exprimierte, als Referenzstamm (Newman Δspa). Mittels Phagen wurde eine Ssl11-Insertionsmutation in den Spa-Mutationsstamm transduziert (Newman $\Delta spa\Delta ssl11$). Sbi ist ebenfalls ein Immunglobulin-Bindeprotein (Zhang et al. 1998). Mittels Phagentransduktion wurde zusätzlich eine Sbi-Deletionsmutation in den Spa-Mutationsstamm integriert (Newman $\Delta spa\Delta sbi$). Das Wachstum der Stämme wurde zur Charakterisierung der generierten *S. aureus*-Mutantenstämme über einen Zeitraum von 24 h erfasst. *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$, $\Delta spa\Delta sbi$ und Δspa zeigten ein sehr ähnliches Wachstum, wiesen gegenüber dem Newman WT jedoch eine Wachstumsdefizienz auf (**Abb. 3.17**).

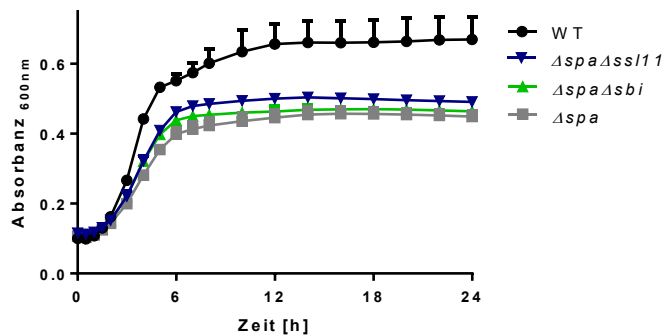


Abbildung 3.17: Die *S. aureus* Mutanten Newman Δspa , $\Delta spa \Delta ssl11$ und $\Delta spa \Delta sbi$ weisen gegenüber dem Wildtyp eine Wachstumsdefizienz auf. Mittels Phagentransduktion wurden $\Delta ssl11$ (Ins) sowie Δsbi (Del) in den Newman Δspa integriert. Das Wachstum der *S. aureus*-Stämme wurde zeitabhängig detektiert. TSB-Medium wurde aus einer üN-Kultur beimpft und bei 37°C für 24 h inkubiert. Alle *S. aureus*-Mutantenstämme wiesen gegenüber dem Newman WT eine Wachstumsdefizienz auf. Ins= Insertionsmutante, Del= Deletionsmutante.

Das Antibiotikum Gramicidin löst bei *S. aureus* Membranporenstress und somit die Aktivierung des Zweikomponentensystems SaeRS aus (Benson et al. 2012). Um Ssl11 besser lokalisieren zu können, wurde die Ssl11 Expression erhöht. Dazu wurde dem Kulturmedium Gramicidin zugefügt. Zunächst wurde in einem Wachstumsversuch mit *S. aureus* Newman WT eine geeignete Gramicidin-konzentration ermittelt. Die Zugabe von 10 µg/ml, 20 µg/ml sowie 40 µg/ml Gramicidin führte, verglichen mit Medium ohne Gramicidin, dosisabhängig zu einer Wachstumsverzögerung, insbesondere innerhalb der ersten 7 h (**Abb. 3.18A**). Da die Staphylokokken dies aber überlebten, wurde in weiteren Versuchen mit 40 µg/ml Gramicidin gearbeitet.

Um Proteine der Membran zu untersuchen, wurden Staphylokokken mit Lysostaphin und Lysozym behandelt. Im Überstand der Membranfraktion des Newman $\Delta spa \Delta sbi$ war Ssl11 mit einem Molekulargewicht von 25 kDa vorhanden, ebenso im Pellet der Membranfraktion des Newman Δspa , dort mit etwa 30 kDa. Nach Zugabe von Gramicidin befand sich mehr Ssl11 im Pellet der Membranfraktion. Für den Stamm Newman $\Delta spa \Delta ssl11$ wurde kein Ssl11 in der Membranfraktion nachgewiesen. Das Immunglobulin-bindende Protein Sbi bindet das Ssl11-Antiserum unspezifisch. Sbi war demnach in der Membranfraktion der Stämme Newman Δspa sowie Newman $\Delta spa \Delta ssl11$, nicht aber im Newman $\Delta spa \Delta sbi$ nachweisbar (**Abb. 3.18B**).

Sekretierte Proteine können im Überstand durch eine Proteinfällung nachgewiesen werden. Im Sekretom von Newman Δspa war Ssl11 vorhanden, wohingegen sich bei Newman $\Delta spa \Delta sbi$ sowie Newman $\Delta spa \Delta ssl11$ kein Ssl11 im extrazellulären Milieu

befand. Erneut wurde das sekretierte Protein Sbi detektiert, welches ebenso membrangebunden vorliegt (Koch et al. 2012). Sekretiertes Sbi wurde nicht für den Stamm Newman $\Delta spa\Delta sbi$ nachgewiesen (**Abb. 3.18C**).

Mittels eines mechanischen Aufschlusses der Staphylokokken wurden die zytosolischen Proteine freigesetzt. Ssl11 war dabei weder in der zytosolischen Fraktion von Newman Δspa , Newman $\Delta spa\Delta sbi$ noch im Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ vorhanden (**Abb. 3.18D**).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich das Protein Ssl11 in der Membranfraktion von *S. aureus* sowie sekretiert im extrazellulären Milieu befindet.

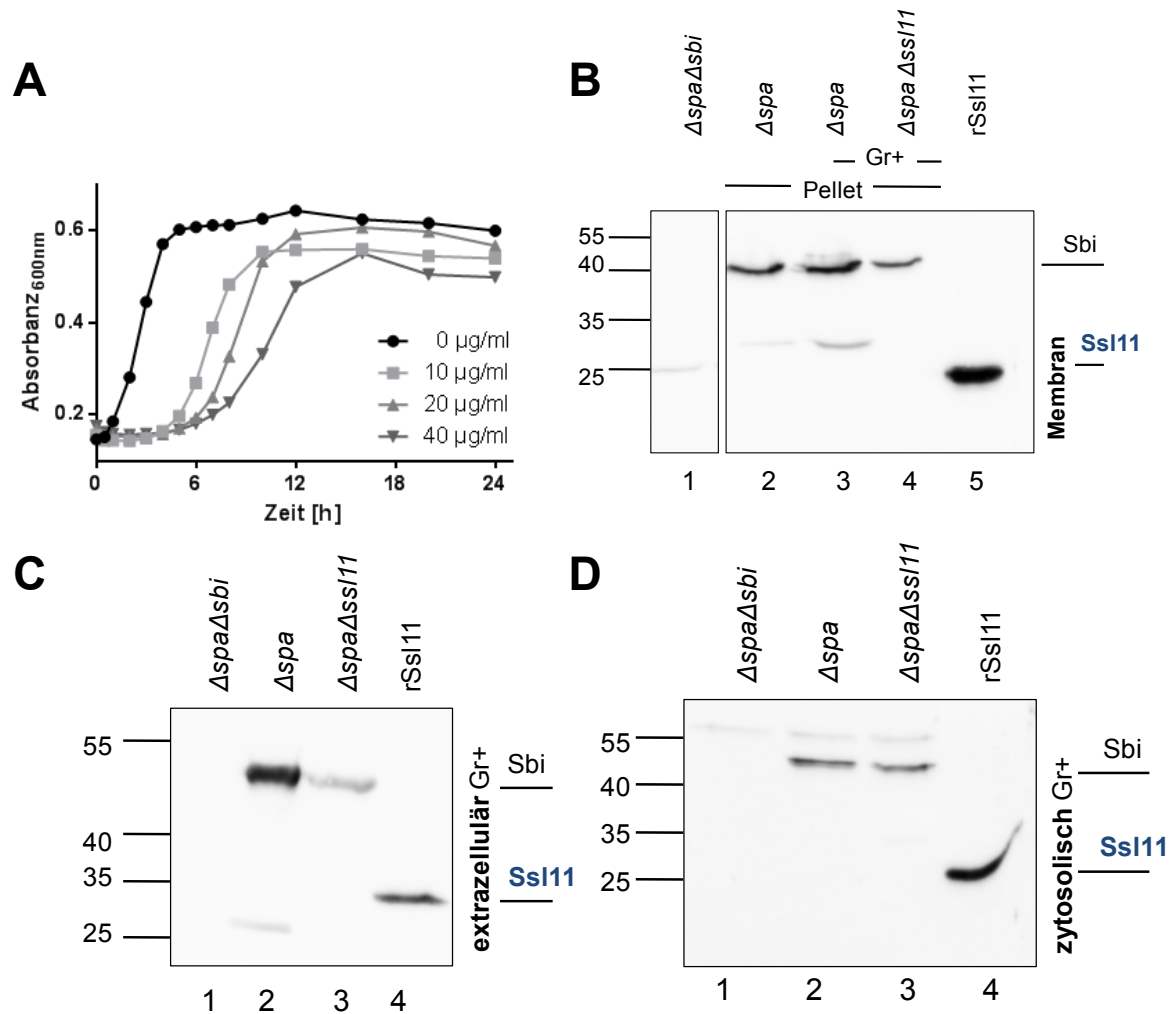


Abbildung 3.18: Ssl11 wird sekretiert und bindet zusätzlich an die Oberfläche von *S. aureus*. Die Expression des Ssl11 wird durch das Zweikomponentensystem SaeRS kontrolliert. Durch das Antibiotikum Gramicidin wird Membranporenstress auf der Staphylokokkenoberfläche ausgelöst, was SaeRS aktiviert und die Expression von Ssl11 induziert. **A** Zur Titration einer geeigneten Gramicidin-konzentration wurden Wachstumsversuche durchgeführt. *S. aureus* Newman WT wurde in TSB, supplementiert mit verschiedenen Konzentrationen von Gramicidin, aus einer üN-Kultur beimpft und 24 h bei 37°C inkubiert. Zugegebenes Gramicidin verlängerte die lag-Phase der Staphylokokken. Die Bakterien waren jedoch auch bei höchster Gramicidinkonzentration wachstumsfähig. Es wurde untersucht, ob Ssl11 in der Membranfraktion, im extrazellulären Raum sowie im Zytosol vorliegt. Die Staphylokokken wuchsen für 6,5 h in BHI-Medium + 40 µg/ml Gramicidin bei 37°C. Die Proteine der Zellfraktionen wurden mittels SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. **B** Zur Analyse der Membranfraktion wurden *S. aureus*-Zellen für 30 min bei 37°C mit Lysostaphin und Lysozym inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation stellte das Pellet die im Gel gezeigte Membranfraktion dar. In allen Proben, ausgenommen der Newman *ΔspaΔss11*, wurde Ssl11 nachgewiesen. **C** Die Proteinfällung des Kulturüberstandes mit TCA ermöglichte die Identifizierung des Ssl11 im Sekretom von *S. aureus* Newman *Δspa*. Im Sekretom von *S. aureus* Newman *ΔspaΔsbi* sowie Newman *ΔspaΔss11* war Ssl11 nicht vorhanden. **D** Zur Untersuchung der zytosolischen Fraktion wurden *S. aureus*-Zellen mechanisch aufgeschlossen. Der Überstand dieser Proben stellte die dargestellte zytosolische Fraktion dar. Ssl11 wurde in keinem der analysierten *S. aureus* Stämme im Zytosol detektiert. Rekombinant exprimiertes Ssl11 (rSsl11) diente jeweils als Positivreferenz. Gr= Gramicidin.

3.3.3 Ssl11 rekrutiert Faktor H an die Oberfläche von *S. aureus*

Ssl11 bindet sowohl Faktor H als auch Plasminogen und Ssl11 ist ein sezerniertes Protein, welches zudem oberflächenlokalisiert vorkommt. Es wurde nachfolgend analysiert, ob Faktor H und Plasminogen durch oberflächenassoziiertes Ssl11 auf die mikrobielle Oberfläche rekrutiert werden. Die Bindung von Faktor H oder Plasminogen aus iNHS an die Oberfläche von *S. aureus* wurde vergleichend für die Stämme *S. aureus* Newman Δspa und Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ untersucht. Die Stämme wurden in Flüssigphase mit iNHS inkubiert und die Bindung von Faktor H oder Plasminogen aus Serum durchflusszytometrisch untersucht.

S. aureus Newman $\Delta spa\Delta ssl11$, welcher kein Ssl11 exprimiert, band signifikant weniger Faktor H auf der mikrobiellen Oberfläche als der Referenzstamm Newman Δspa (Abb. 3.19A). Plasminogen aus iNHS wurde ebenfalls auf Bindung an *S. aureus* Newman Δspa sowie Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ geprüft. Die Bindung von Plasminogen an *S. aureus* war bei An- und Abwesenheit von Ssl11 nicht signifikant verändert (Abb. 3.19B).

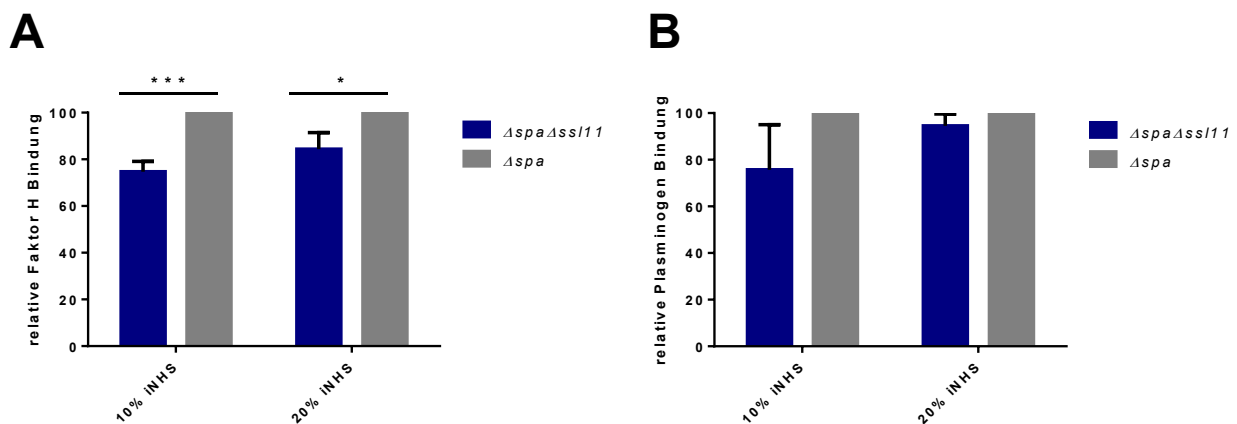


Abbildung 3.19: Die Ssl11-Mutante bindet weniger Faktor H auf der *S. aureus* Oberfläche. *S. aureus* bindet die Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen. Es wurde untersucht, inwiefern membrangebundenes Ssl11 die Regulatorbindung beeinflusst. *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ und Newman Δspa wurden mit iNHS inkubiert. **A** *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ band signifikant weniger Faktor H als Newman Δspa . **B** *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ und Newman Δspa banden gleiche Mengen Plasminogen auf der Erregeroberfläche. Die Prozentangaben beziehen sich auf die als Referenz gesetzten Werte der Bindungen des *S. aureus* Newman Δspa . Die gezeigten Daten zeigen MW und SA aus drei (A) bzw. zwei (B) unabhängigen Durchflusszytometrie-Versuchen. * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$.

3.3.4 Ssl11 reduziert die C3b-Deposition auf der *S. aureus* Oberfläche

Ssl11 befindet sich auf der Oberfläche von *S. aureus* und rekrutiert funktionell aktiven Faktor H. Um zu untersuchen, ob rekrutierter Faktor H die Deposition von C3b und somit die Opsonisierung des Mikroorganismus bzw. die Aktivierung des alternativen

Komplementweges beeinflusst, wurde das Vorhandensein von C3b auf Ssl11-exprimierenden (Newman Δspa) und nicht exprimierenden (Newman $\Delta spa\Delta ssl11$) Staphylokokken analysiert. Die *S. aureus* Stämme wurden hierfür mit komplement-aktivem Serum inkubiert. Die Deposition des C3bs wurde durchflusszytometrisch ermittelt.

In Anwesenheit von Ssl11 (*S. aureus* Newman Δspa) war die Deposition von C3b reduziert (**Abb. 3.20**). Nach 20 min Inkubation mit NHS war 33% mehr C3b auf Staphylokokken abgelagert, die Ssl11 nicht exprimieren (Newman $\Delta spa\Delta ssl11$).

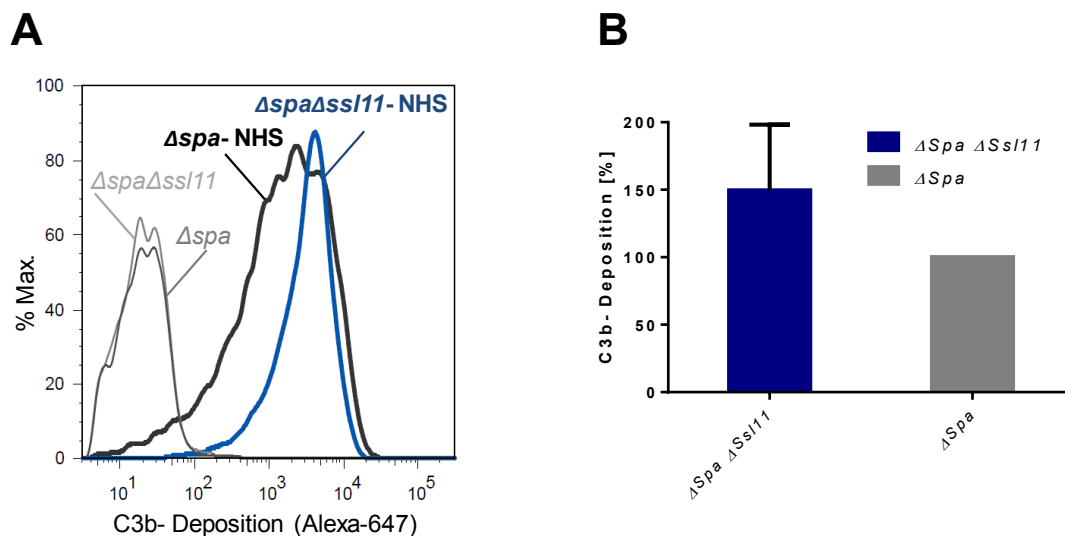


Abbildung 3.20: Ssl11 reduziert die C3b-Deposition auf der Oberfläche von *S. aureus*. **A** Die Analyse der C3b-Deposition in An- und Abwesenheit von Ssl11 wurde mit *S. aureus*-Mutanten analysiert. *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ und Newman Δspa wurden mit 10 % NHS bei 37°C opsonisiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde das Vorhandensein von C3b auf der *S. aureus* Oberfläche detektiert. **B** Die C3b-Deposition war um 33% verringert, wenn Ssl11 auf der Oberfläche von *S. aureus* vorhanden war. Die gezeigten Daten zeigen MW und SA aus drei unabhängigen Versuchen.

3.3.5 Makrophagen phagozytieren C3b-opsonisierte *S. aureus*

Membranassoziiertes Ssl11 reduziert die C3b-Deposition auf der *S. aureus* Oberfläche. C3b wie auch iC3b sind Opsonine, welche phagozytische Zellen über Rezeptoren zur Aufnahme der mittels Opsoninen markierten Bakterien anregen. Es wurde daher untersucht, ob die durch Ssl11 verursachte verringerte C3b-Deposition die Phagozytose durch humane Makrophagen beeinflusst.

Die Monozytenzelllinie THP-1 wurde zur Differenzierung zu Makrophagen mit PMA stimuliert. Über einen Zeitraum von 4 h wurden adhärenzte Makrophagen mit *S. aureus* Newman Δspa sowie Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ inkubiert.

Die humanen THP1-Makrophagen phagozytierten die zur C3b-Opsonisierung mit NHS inkubierten Staphylokokkenstämme Newman Δspa und Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ zeitabhängig (Daten nicht gezeigt). In Abwesenheit von Ssl11 (Newman $\Delta spa\Delta ssl11$) unterschied sich die Phagozytose von Staphylokokken durch Makrophagen nicht von der Phagozytoserate von Ssl11-exprimierenden *S. aureus* (Newman Δspa) (**Abb. 3.21A**). Die durch Ssl11 hervorgerufene verringerte C3b-Deposition führte nicht zu einer reduzierten Aufnahme von *S. aureus* durch humane Makrophagen (**Abb. 3.21B**).

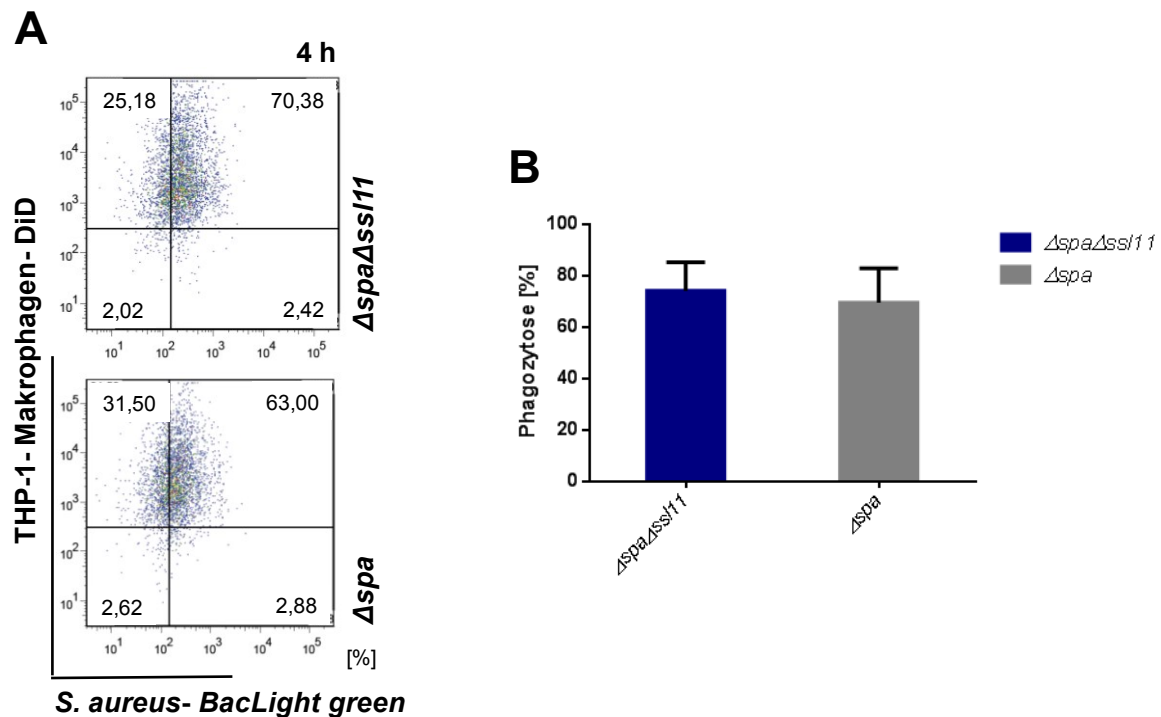


Abbildung 3.21: Die Phagozytose von *S. aureus* durch humane Makrophagen ist nicht durch Ssl11 beeinflusst. Makrophagen phagozytieren effektiv C3b-opsonisierte Staphylokokken. *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ und Newman Δspa wurden mit *BacLight green* markiert, mit 10 % NHS opsonisiert und anschließend mit DiD-markierten THP-1-Makrophagen in einer MOI von 10 inkubiert. Die Phagozytoseraten wurden durchflusszytometrisch detektiert. **A** Die Makrophagen nehmen *BacLight green*-gefärbte *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ und Newman Δspa auf. Die Abbildungen sind repräsentativ für zwei Versuche. **B** Es wurde die Phagozytoserate der Makrophagen ermittelt. Von den Messwerten wurde der Basiswert zum Zeitpunkt t_0 subtrahiert. *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ und Newman Δspa wurden gleichermaßen stark von THP1-Makrophagen phagozytiert. Die gezeigten Daten zeigen MW und SA aus zwei unabhängigen Versuchen.

3.3.6 Ssl11 reduziert die Phagozytose von *S. aureus* durch neutrophile Granulozyten

Die Phagozytose von Immunglobulin- und C3b-opsonisierten Staphylokokken wird zumeist durch neutrophile Granulozyten, den wichtigsten Phagozyten der angeborenen Immunität, realisiert. Es wurde analysiert, ob die Ssl11-induzierte verringerte C3b-Deposition auf *S. aureus* die Phagozytose durch primäre humane

neutrophile Granulozyten verringert. Die Phagozytose von *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ und Newman Δspa durch Neutrophile wurde zeitabhängig mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Staphylokokken, die kein Ssl11 exprimieren (Newman $\Delta spa\Delta ssl11$) wurden nach 25 min gegenüber Ssl11-exprimierenden *S. aureus* (Newman Δspa) um 13-14 % stärker durch neutrophile Granulozyten phagozytiert (**Abb. 3.22B**).

Während die Phagozytose durch die Makrophagen-Zelllinie THP-1 über einen Zeitraum von 4 h analysiert wurde (**Abb. 3.21**), nahmen die neutrophilen Granulozyten opsonisierte Staphylokokken bereits innerhalb von 25 min sehr effektiv auf (**Abb. 3.22A**).

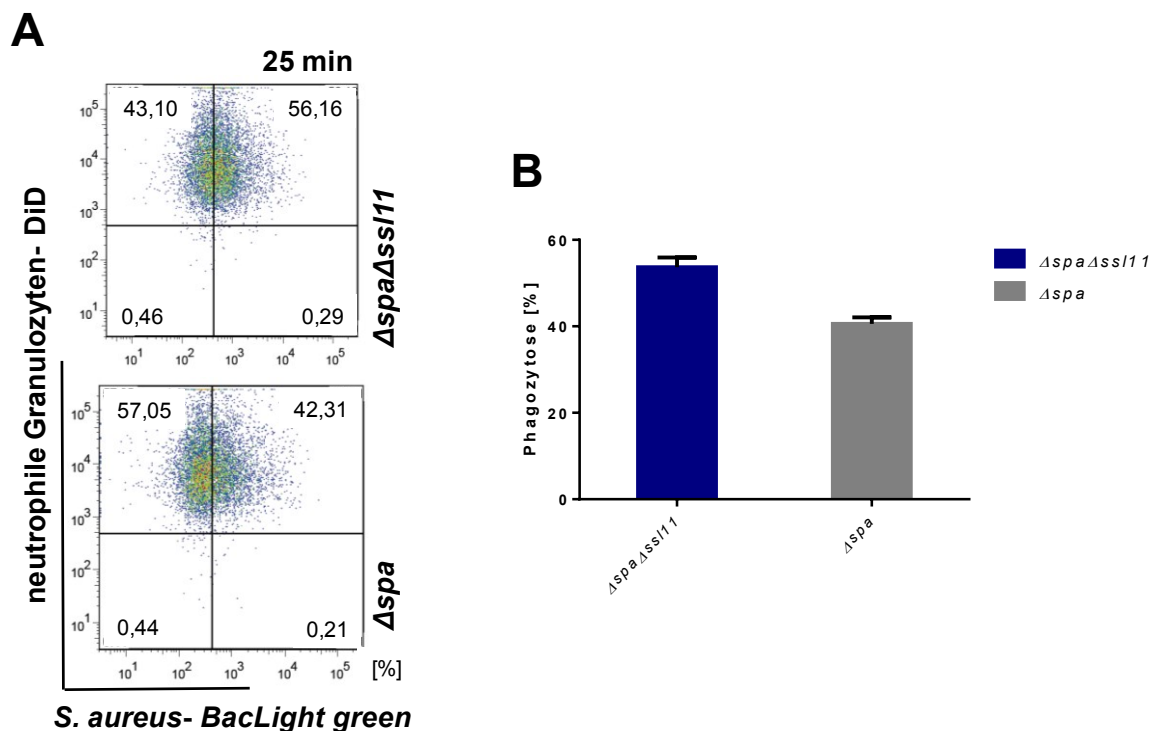


Abbildung 3.22: Die Phagozytose von *S. aureus* durch neutrophile Granulozyten ist in Anwesenheit von Ssl11 verringert. Die Phagozytose von *S. aureus* im menschlichen Körper findet zum Großteil durch neutrophile Granulozyten statt. *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ und Newman Δspa wurden mit BacLight green markiert, mit 10 % NHS opsonisiert und anschließend mit DiD-markierten isolierten primären humanen neutrophilen Granulozyten in einer MOI von 10 inkubiert. Die Phagozytoseraten wurden durchflusszytometrisch detektiert. **A** Die neutrophilen Granulozyten nahmen BacLight green-gefärbte *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ und Newman Δspa auf. Die Abbildungen sind repräsentativ für zwei Versuche. **B** Es wurde die Phagozytoserate der neutrophilen Granulozyten ermittelt. Von den Messwerten wurde der Basiswert zum Zeitpunkt t0 subtrahiert. War Ssl11 auf der Oberfläche von *S. aureus* vorhanden (Newman Δspa), wurden nach 25 min etwa 14 % weniger Staphylokokken phagozytiert als bei Abwesenheit von Ssl11 (*S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$). Die gezeigten Daten zeigen MW und SA aus zwei unabhängigen Versuchen.

Die Phagozytoserate wurde über die Detektion doppelt positiver Ereignisse bestimmt: den DiD-gefärbten neutrophilen Granulozyten, welche *BacLight green*-gefärbte *S. aureus* aufgenommen hatten. Um festzustellen, ob bei doppelt positiven Ereignissen tatsächlich die Phagozytose der Staphylokokken und nicht die Adhäsion der Bakterien an die neutrophilen Granulozyten stattgefunden hat, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Die Membran der neutrophilen Granulozyten wurde mit DiD (rot) und der Zellkern mit DAPI (cyanblau) gefärbt. Staphylokokken wurden mit *BacLight green* markiert. Neutrophile Granulozyten und *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ss/11$ sowie Newman Δspa , welche zuvor zur Opsonisierung mit 10 % NHS inkubiert wurden, wurden koinkubiert. Zur Quantifizierung phagozytierter und adhärenter Staphylokokken wurden für *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ss/11$ sowie Newman Δspa pro mikroskopischer Aufnahme zwei neutrophile Granulozyten ausgewählt und jeweilige phagozytierte, adhärente und extrazelluläre Staphylokokken quantitativ erfasst. Während die Reduktion des Membranfarbstoffes die Erfassung intrazellulär lokalisierter Staphylokokken ermöglichte (**Abb. 3.23 Aa-Ab, Abb. 3.23 Ba-Bb**), visualisieren 3D-Aufnahmen die Vorder- und Rückseite der neutrophilen Granulozyten zur Detektion adhärenter Staphylokokken (**Abb. 3.23 Ac-Ad, Abb. 3.23 Bc-Bd**).

Die neutrophilen Granulozyten phagozytierten *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ss/11$ (**Abb. 3.23A**) sowie Newman Δspa (**Abb. 3.23B**). *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ss/11$ sowie Newman Δspa befanden sich zu 66-70 % im extrazellulären Milieu. 27-28 % der Staphylokokken wurden phagozytiert und waren demnach intrazellulär lokalisiert. Lediglich 3-6 % waren adhärent (**Abb. 3.23C**). Die doppelt positiv erfassten Ereignisse in der Durchflusszytometrie stellen somit mehrheitlich durch neutrophile Granulozyten phagozytierte Staphylokokken dar.

Der im Durchflusszytometer erkennbare Unterschied in der Phagozytoserate von *S. aureus* Newman Δspa verglichen mit dem Newman $\Delta spa\Delta ss/11$ wurde in diesen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nicht bestätigt. Es wurde jedoch auch lediglich eine geringe Anzahl an neutrophilen Granulozyten detektiert und für die quantitative Auswertung verwendet.

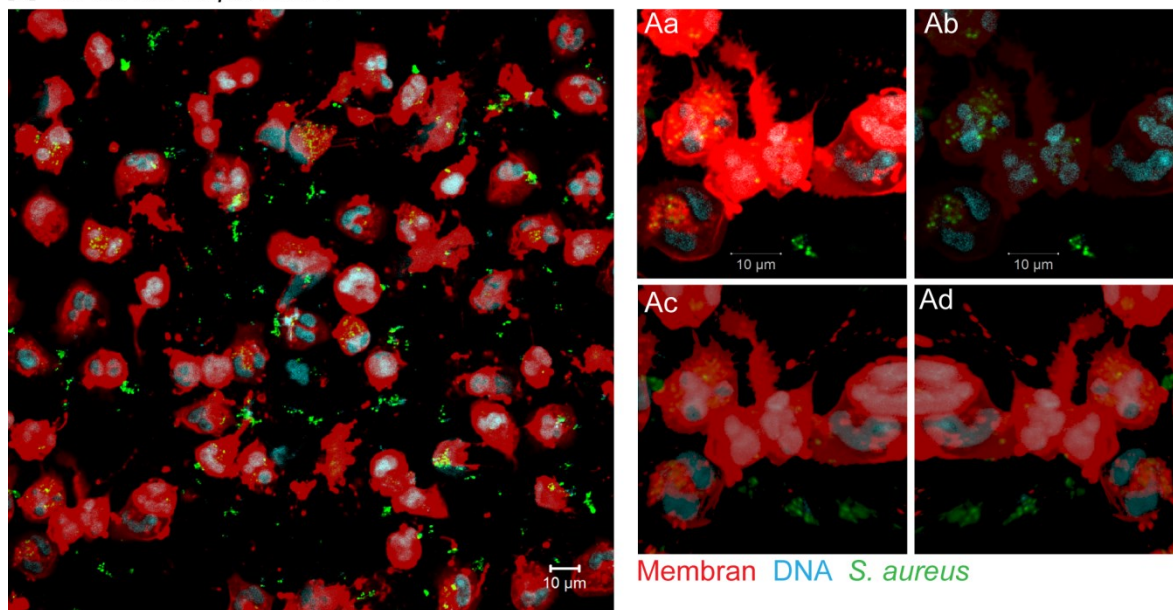
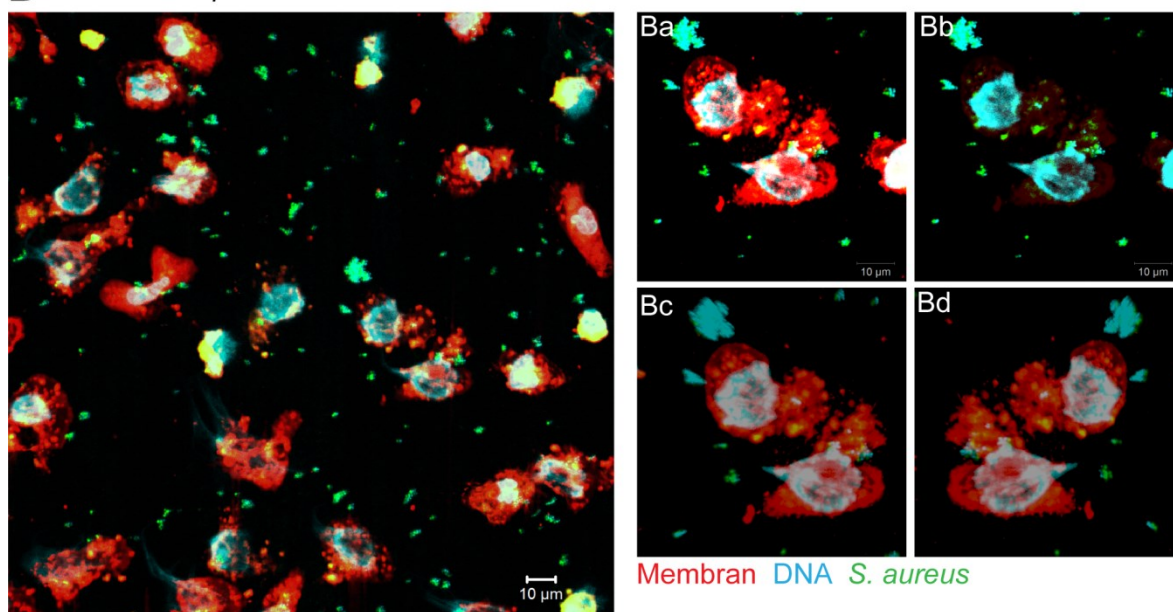
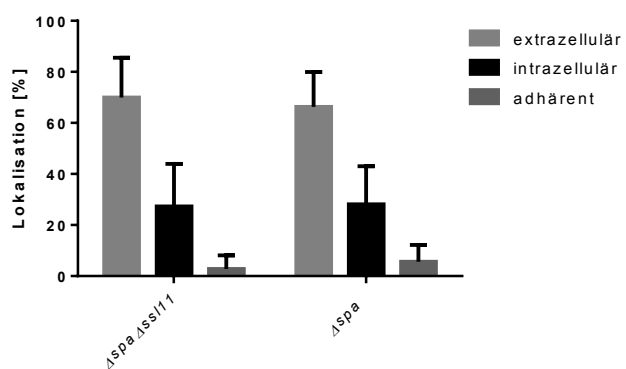
A *S. aureus* Δspa $\Delta ssl11$ **B** *S. aureus* Δspa **C**

Abbildung 3.23: *S. aureus* wird von neutrophilen Granulozyten phagozytiert und adhärert in geringem Maß an die phagozytischen Zellen. Um die Phagozytose von *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ und Newman Δspa durch neutrophile Granulozyten zu visualisieren und um zwischen Adhäsion und Phagozytose unterscheiden zu können, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Neutrophile Granulozyten wurden mit dem Membranfarbstoff DiD und dem DNA-Farbstoff DAPI gefärbt. Gefärbte humane neutrophile Granulozyten und *BacLight green*-gefärbte und opsonisierte *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ und Newman Δspa wurden für 40 min koinkubiert. **A** Neutrophile Granulozyten phagozytierten *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$. **Aa, Ab** Eine Reduktion der Intensität des Membranfarbstoffs DiD ermöglichte das Sichtbarmachen der intrazellulär lokalisierten Staphylokokken. **Ac, Ad** 3D-Aufnahmen visualisieren die Vor- (**Ac**) und Rückseite (**Ad**) der neutrophilen Granulozyten zur Detektion von adhärenenten Staphylokokken. Nur wenige Staphylokokken waren adhärenent. **B** Neutrophile Granulozyten phagozytierten *S. aureus* Newman Δspa . **Ba, Bb** Die Reduktion der Intensität des Membranfarbstoffs DiD ermöglicht das Sichtbarmachen der intrazellulär lokalisierten Staphylokokken. **Bc, Bd** 3D-Aufnahmen visualisieren die Vor- (**Bc**) und Rückseite (**Bd**) der neutrophilen Granulozyten zur Detektion von adhärenenten Staphylokokken. **C** Es erfolgte eine quantitative Auswertung zur Anzahl adhärenenten und intrazellulärer Staphylokokken. Für drei Aufnahmen pro *S. aureus* Stamm wurden jeweils zwei neutrophile Granulozyten ausgewählt. Für diese neutrophilen Granulozyten wurden die extrazellulären, adhärenenten sowie intrazellulären phagozytierten Staphylokokken erfasst. *S. aureus* Newman $\Delta spa\Delta ssl11$ sowie auch Newman Δspa befanden sich zu 66-70 % extrazellulär. 27-28 % der Staphylokokken wurden phagozytiert und waren demnach intrazellulär lokalisiert und lediglich 3-6 % waren adhärenent.

3.4 Ssl11 beeinflusst die Virulenz *in vivo*

Ssl11 wurde *in vitro* als Virulenzprotein von *S. aureus* identifiziert. Die Wachsmottenlarve *G. mellonella* eignet sich für erste *in vivo* Analysen hinsichtlich der Virulenz von Erregerproteinen. Mittels des Ssl11-Mutantenstammes wurde der Einfluss von Ssl11 auf die Virulenz von *S. aureus in vivo* in *G. mellonella* analysiert.

Die Virulenz des PurA-Mutantenstammes gegenüber dem Newman Wildtyp ist stark attenuiert (Selle 2015). *S. aureus* Newman $\Delta purA$ diente daher in diesem Versuch als Positivkontrolle. Gegenüber dem Newman Wildtyp war die Virulenz der Ssl11-Mutante geringfügig attenuiert.

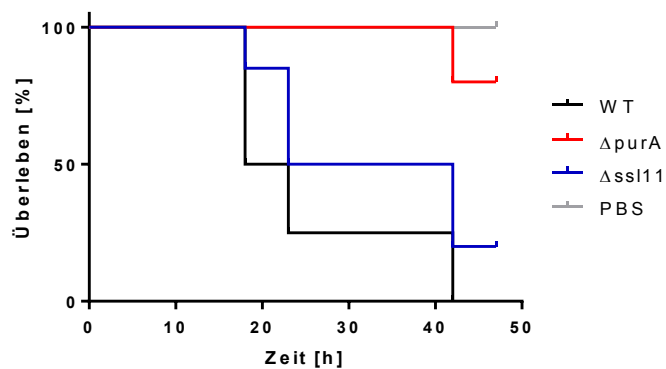


Abbildung 3.24: Ssl11 trägt in geringem Maß zur Virulenz von *S. aureus* bei. Die Virulenz von Ssl11 wurde in einem *in vivo* Überlebensversuch in der Wachsmottenlarve *G. mellonella* untersucht. Es wurden *S. aureus* Newman WT, Newman $\Delta ssl11$, Newman $\Delta purA$ sowie PBS in *G. mellonella* injiziert und das Überleben der Larven bei 37°C zeitabhängig erfasst. Die Virulenz des Ssl11-Mutantenstammes war gegenüber dem WT etwas schwächer. *S. aureus* Newman $\Delta purA$ diente als Positivreferenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei Versuche.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung der beiden *S. aureus* Proteine Ssl11 und PurA an die Regulatoren Faktor H und Plasminogen identifiziert und hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Komplementkaskade charakterisiert. Zudem wurde der Einfluss dieser Inhibition auf die Phagozytose von *S. aureus* durch Makrophagen und Neutrophile untersucht. *In vivo* Untersuchungen mit der Wachsmottenlarve *G. mellonella* dienten der ersten Validierung der *in vitro* erhobenen Daten im lebenden Organismus.

4.1 Ssl11 und PurA binden den funktionell aktiven Komplementregulator Faktor H

Der humane Komplementregulator Faktor H hat eine Schlüsselfunktion in der Regulation der C3-Spaltung. Die Rekrutierung des humanen Komplementregulators Faktor H ist daher eine häufig vorkommende Komplementevasionsstrategie von Mikroorganismen. Mittels eines Proteinarrays wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Faktor H-bindende Proteine von *S. aureus* identifiziert. Ursprünglich wurde dieser Assay zur Untersuchung von Plasma-Antikörper-Antworten auf spezifische *S. aureus* Proteine verwendet (Kloppot et al. 2015). In der heutigen funktionellen Proteomforschung ist der Proteinarray jedoch vielseitig einsetzbar (Lueong et al. 2014).

Die *S. aureus* Proteine Ssl11 und PurA rekrutieren den humanen Komplementregulator Faktor H. Ssl11 band Faktor H mit 36-fach höherer Affinität, nämlich 2,56 nM, als PurA, wo die Affinität 92,4 nM betrug. Die Stabilität der Ssl11-Faktor H-Bindung war etwa 10-fach stärker als die der PurA-Faktor H-Bindung. Als weitere Faktor H-rekrutierende Proteine von *S. aureus* sind bereits Sbi, SdrE sowie Efb und Ecb bekannt (**Kap. 1.2.13**). Diese Komplementevasionsstrategie nutzen neben *S. aureus* auch andere grampositive, aber auch gramnegative Bakterien sowie einige Pilze. Genannt seien hier beispielhaft *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) mit den Proteinen Pneumokokken-Oberflächenprotein C (*pneumococcal surface protein C*, PspC) und Elongationsfaktor Tu (*elongation factor Tu*, Tuf) (Mohan et al. 2014; Meinel et al. 2017), Protein H von *Hämophilus influenzae* (*H. influenzae*) (Fleury et al. 2014), ebenso wie Gpd2 sowie Phosphoglyceratmutase 1 (Gpm1) von *C. albicans* (Luo et al. 2013; Lopez et al. 2014). Die ermittelte Affinität der *S. aureus* Proteine Ssl11 und PurA ist der bereits bekannten Bindeaffinität des Faktor H-

bindenden Proteins PspC von *S. pneumoniae* ähnlich. Die PspC-Varianten binden Faktor H z. B. jeweils mit 16,6 nM und 29,4 nM (Meinel 2017).

Ssl11 ist nicht das erste beschriebene Protein der Ssl-Familie, das eine Interaktion mit dem humanen Komplementsystem eingeht. Auch Ssl7 inhibiert das Komplement, indem es die Immunglobuline IgA und IgG sowie das Komplementprotein C5 bindet (Langley et al. 2005; Itoh et al. 2010; Laursen et al. 2010). Die Bindung von Ssls an Komplementregulatoren, wie Faktor H, wurde bisher noch nicht beschrieben und ist somit derzeit einzigartig für Ssl11. Ebenfalls neuartig ist die Art und Weise, wie Ssl11 Faktor H bindet. Ssl11 wies in den Bindungsstudien keine spezifische Faktor H-Bindung zu Faktor H-Fragmenten auf. Es konnte lediglich die Tendenz einer Bindung an SCRs 18-20 festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass das komplette Faktor H-Protein für eine Bindung an Ssl11 notwendig ist, was möglicherweise eine Änderung der Konformation im Faktor H hervorruft. Bisher wurde diese spezielle Ssl11-Faktor H-Bindung noch nicht im Detail charakterisiert. Um dies zu untersuchen, würde sich beispielsweise die Analyse der Kristallstruktur des Ssl11 im Komplex mit Faktor H anbieten.

PurA hingegen band an Faktor H SCRs 1-7, SCRs 8-20 sowie SCRs 18-20. Es konnte jedoch keine eindeutige Bindung an SCR 18, SCR 19 oder SCR 20 nachgewiesen werden. Möglicherweise ist für die PurA-Faktor H-Interaktion somit die komplette C-terminale Domäne SCRs 18-20 relevant. PurA weist, im Gegensatz zu Ssl11, Faktor H-Bindedomänen auf, welche auch für bereits charakterisierte Virulenzfaktoren beschrieben sind: Regionen, die häufig von mikrobiellen Proteinen gebunden werden, sind SCRs 1-7, SCRs 8-11 und SCRs 18-20. So bindet das *S. pneumoniae* Protein Tuf Faktor H beispielsweise in den SCRs 1-6, SCRs 1-7, SCRs 15-20 sowie SCRs 18-20 (Mohan et al. 2014).

PurA wiederum bindet Faktor H innerhalb von 200 Aminosäuren in der N-terminalen Domäne. Die PurA-Faktor H-Bindung zeigt sich dabei unabhängig von den in der Purinbiosynthese essentiellen aktiven Zentren, welche für die Bindung der Substrate IMP, GTP, Magnesium-Ionen und Aspartat notwendig sind (Selle 2015). Im Zytosol fungiert PurA somit als Katalysator der Purinbiosynthese. Die Funktion des membranassoziierten PurA als Virulenzfaktor ist unabhängig von der Biosynthesefunktion. Dieser Sachverhalt verdeutlicht, dass PurA ein *moonlighting* Protein ist.

Viele Evasionsproteine binden neben Faktor H auch Faktor H-verwandte Proteine. Dem liegt die strukturelle Ähnlichkeit der Proteine zugrunde. FHL-1 besteht aus den SCRs 1-7 von Faktor H und die CFHR1-Struktur ist den SCRs 6-7 und SCRs 18-20 von Faktor H ähnlich. Ssl11 band ausschließlich das vollständige Faktor H-Protein. Dementsprechend wies Ssl11 keine spezifische Bindung an FHL-1 oder CFHR1 auf. Eine spezifische Bindung an Faktor H, aber nicht an FHL-1, wie Ssl11 es zeigt, ist bisher für kein anderes Evasionsprotein beschrieben. Dieser scheinbar widersprüchliche Sachverhalt ist jedoch damit zu erklären, dass Ssl11 nur das komplette Faktor H bindet, bzw. eine Tendenz zur Bindung an SCRs 18-20 zeigt, welche aber nicht Bestandteil des FHL-1 sind. PurA hingegen band, neben Faktor H, sowohl FHL-1 als auch CFHR1. Dies resultiert daraus, dass die Faktor H-Bindestellen von PurA unter anderem in SCR 7 sowie SCRs 18-20 lokalisiert sind und diese auch Bestandteile von FHL-1 sind sowie starke Homologien zu den CFHR1-Untereinheiten besitzen. Ähnlich wie PurA bindet das *C. albicans* Protein Gpd2 Faktor H und FHL-1 (Luo et al. 2013).

Die Funktion der Bindung von PurA an CFHR1 ist derzeit nicht charakterisiert. CFHR1 inhibiert die Aktivität der C5-Konvertase, indem es an das C3b dieser Konvertase bindet. Zudem verhindert CFHR1 die Assemblierung des TCC. Die genauen Mechanismen sind bisher nicht beschrieben. CFHR1 kompetitiert zudem mit Faktor H um die Bindung an C3-Moleküle (Fritsche et al. 2010). Ob PurA durch die Rekrutierung des CFHR1 die TCC-Assemblierung auf Staphylokokken inhibiert, ist noch unklar und müsste in zukünftigen Analysen untersucht werden.

Während CFHR1 ein Regulator des TCC ist, modulieren Faktor H und FHL-1 den alternativen Aktivierungsweg. Durch Ssl11 gebundener Faktor H behielt seine Kofaktoraktivität gegenüber dem Faktor I. Ssl11 inhibierte zudem die Aktivierung des alternativen Weges auf C3b- und auch auf TCC-Ebene in einem Komplementaktivierungsversuch, ähnlich wie Gpd2 (Luo et al. 2013). Ssl11 ist somit ein neu identifizierter Inhibitor des alternativen Weges. PurA zeigte keinen Einfluss auf die Aktivierung des alternativen Weges, obwohl durch PurA gebundener Faktor H wie auch FHL-1 Kofaktoraktivität für Faktor I besitzen. Verglichen mit dem Ssl11-Faktor H-Komplex war die Kofaktor-Aktivität von PurA gebundenem Faktor H allerdings geringer. Möglicherweise war die geringere Bindungsaffinität von PurA an Faktor H ursächlich für eine geringere Menge an gebundenem Faktor H, woraus

wiederum die geringere Kofaktor-Aktivität des entsprechenden Komplexes resultierte. Verglichen mit Ssl11 wäre ein inhibitorischer Einfluss durch PurA folglich schwieriger zu detektieren.

Sehr wahrscheinlich wird die nachgewiesene Inhibition des alternativen Weges durch Ssl11 unter anderem durch die Aktivität des Faktor H als Kofaktor sowie die durch Faktor H verursachte Inhibition auf Ebene der C3-Konvertase hervorgerufen. Zukünftige *in vivo* Untersuchungen könnten Aufschluss darüber geben. Durch die Rekrutierung des humanen Faktor H an die mikrobielle Oberfläche zerfallen dort gebildete C3-Konvertasen und *S. aureus* entzieht sich der Erkennung durch das Komplementsystem. Eine derartige Rekrutierung von funktionell aktivem Faktor H und FHL-1 wurde bereits mehrfach beschrieben: auch durch die *S. aureus* Proteine Sbi, Efb und SdrE rekrutierter Faktor H agiert im gebundenen Zustand als Kofaktor für die Protease Faktor I (Sharp et al. 2012; Böhm 2013; Koch et al. 2012). Vom *S. pneumoniae* Protein Tuf gebundener Faktor H ebenso wie Tuf gebundenes FHL-1 behalten ihre Kofaktoraktivität ebenfalls bei (Mohan et al. 2014).

Zusammenfassend wurde Ssl11 als Faktor H bindendes Protein identifiziert, wobei es sich um einen neuartigen, bisher uncharakterisierten Bindemechanismus handelt. PurA band neben Faktor H sowohl FHL-1 als auch CFHR1. Sowohl Ssl11 als auch PurA waren in *in vitro* Studien befähigt, Faktor H zu rekrutieren, der im Komplex mit diesen Proteinen funktionell aktiv blieb. So unterstützen Ssl11 und PurA *S. aureus* dabei, das Komplementsystem zu umgehen.

4.2 Ssl11 und PurA binden den funktionell aktiven Komplementregulator

Plasmin(ogen)

Plasminogen ist ein Regulator des Komplementsystems und Modulator der Fibrinolyse und der Koagulationskaskade. In seiner Rolle als Komplementregulator spaltet Plasmin die zentralen Komplementproteine C3, C3b und C5. Damit reguliert Plasminogen die Komplementkaskade auf Ebene der C3- und C5-Konvertasen. Die Strategie der Rekrutierung humanen Plasminogens mit dem Ziel der Immunevasion ist unter grampositiven und gramnegativen Bakterien wie auch unter Pilzen konserviert (Luo et al. 2015). Beispielsweise rekrutiert *S. aureus* Plasminogen bzw. Plasmin an seine Oberfläche (Pietrocola et al. 2016; Mölkänen et al. 2002), wo es aktiviert werden kann, um so die humane Immunantwort zu umgehen.

Ssl11 und PurA sind neu identifizierte Plasminogen-bindende Staphylokokken Proteine. Ssl11 ist somit das erste Superantigen-ähnliche Protein, für das eine Interaktion mit Plasminogen beschrieben ist. Bezugnehmend auf PurA wurde bereits 2002 dargestellt, dass Staphylokokken Proteine mit *moonlighting* Funktion Plasminogen rekrutieren (Mölkänen et al. 2002).

Bisher sind acht Staphylokokken Proteine identifiziert, die Plasminogen binden: FnBPA und FnBPB, α -Enolase, Ribonukleotid Reduktase und IMPDH, MntC, Sbi und Efb (**Kap. 1.2.13**). Verschiedene Spezies des grampositiven Bakteriums *Streptococcus* exprimieren u. a. die Plasminogen-bindenden Proteine PspC, Endopeptidase O (PepO), Enolase, ein M-Protein (PAM), das M-Protein ähnliche Protein (*M-protein related protein*, Prp) und das Serindomänen-reiche Protein 2 (*serin rich repeat protein 2*, Srr2) (Agarwal et al. 2013; Bergmann et al. 2013; Berge und Sjöbring 1993; Sanderson-Smith et al. 2007; Six et al. 2015). Auch viele Proteine gramnegativer Erreger binden Plasminogen. Dabei wurde die regulatorische Aktivität des Plasmins jeweils auch im rekrutierten Zustand nachgewiesen. So binden beispielsweise Protein E von *H. influenzae* (Barthel et al. 2012b), Tuf von *P. aeruginosa* (Kunert et al. 2007) und *complement receptor acquiring surface protein 1* (CRASP1) sowie die äußeren Oberflächen-proteine A und C (*outer surface protein*, OspA, OspC) von *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) (Kraiczy et al. 2006; Fuchs et al. 1994; Önder et al. 2012; Hallström et al. 2010). Die Pilzproteine pH-reguliertes Antigen 1 (Pra1) und Gpm1 von *C. albicans* rekrutieren ebenfalls Plasminogen (Luo et al. 2009; Poltermann et al. 2007). Derzeit sind zudem 13 *moonlighting* Proteine als Plasminogen-bindend beschrieben (Henderson 2014). Viele dieser Proteine binden auch weitere Komplementregulatoren und Plasmaproteine, wie Fibrinogen, Faktor H, FHL-1, CFHR1 und C4BP.

Ssl11 bindet Plasminogen mit einer Affinität von 133,6 nM, während die PurA-Plasminogen-Bindung mit 252,7 nM halb so hoch liegt. Die Bindungskonstanten sind damit jeweils niedriger als die Konstante von Plasminogen-bindenden *moonlighting* Proteinen mit 10-0,1 nM (Henderson 2014) sowie Prp (7,6 mM) und PAM (1,6 nM) von *S. pyogenes* (Sanderson-Smith et al. 2007). Zwei Varianten des PspC von *S. pneumoniae* weisen hingegen schwächere Affinitäten von 489 nM und 568 nM auf (Meinel 2017). Verglichen mit Faktor H banden Ssl11 und PurA Plasminogen mit

geringerer Affinität. Dennoch waren die Komplexe relativ stabil, insbesondere im Fall von Ssl11.

Die Bindung durch die mikrobiellen Proteine wird über Lysine im Plasminogen realisiert. ϵ -Aminocaprinsäure (ϵ ACA) ist ein synthetisches Lysinanalogue. Durch Einsatz des lysinähnlichen ϵ ACA kann die Bindung mikrobieller Proteine an Lysine im Plasminogen blockiert werden. Bereits 5 mM ϵ ACA als inhibierendes Agens waren ausreichend, um die Bindung von Ssl11 und PurA an Plasminogen beinahe vollständig zu unterbinden. Ein ähnlicher Effekt von ϵ ACA ist auch für Sbi und Efb von *S. aureus* beschrieben (Koch et al. 2012). Plasminogen-bindende Proteine von anderen Mikroorganismen, beispielsweise Protein E von *H. influenzae* (Barthel et al. 2012b), CRASP1 bis CRASP5 von *B. burgdorferi* (Hallström et al. 2010; Brissette et al. 2009) sowie Pra1 und Gpm1 von *C. albicans* rekrutieren Plasminogen ebenfalls über dessen Lysinbindestellen (Luo et al. 2009; Poltermann et al. 2007). Interessanterweise bindet das Prp von *S. pyogenes* Plasminogen nicht ausschließlich über Lysin-Reste, sondern auch über Arginin und Histidin (Sanderson-Smith et al. 2007).

Mikroorganismen wie *S. aureus* rekrutieren Plasminogen zur Immunevasion und zur Invasion in Gewebe. Ssl11 und PurA gebundenes Plasminogen kann vom humanen Aktivator uPa in komplementregulatorisch aktives Plasmin umgesetzt werden. Durch Ssl11 gebundenes Plasminogen wurde mittels humanem uPa ebenso effizient zu Plasmin konvertiert wie Plasminogen allein. Die Aktivität von PurA gebundenem Plasmin(ogen) war, verglichen mit Ssl11-gebundenem, etwas geringer.

Die meisten klinisch relevanten *S. aureus* Stämme exprimieren zudem die Staphylokinase (SAK) (Peetermans et al. 2014). Die SAK fungiert, wie auch uPa, als Aktivator des Proenzym Plasminogen. Ssl11- und PurA-gebundenes Plasminogen, wird mit SAK zu Plasmin aktiviert und ist funktionell als Protease tätig. Im Gegensatz zum uPa, wo die Aktivierung über eine proteolytische Spaltung des Plasminogens verläuft, lagert sich SAK an das Plasminogen an. Dadurch entsteht das proteolytisch aktive Plasmin. Die Expression eines eigenen mikrobiellen Plasminogen-Aktivators zeigt, dass Mikroorganismen die proteolytische Aktivität des Plasmins zur Evasion des Komplements nutzen (Lähteenmäki et al. 2001). Auch in Abwesenheit des humanen uPas kann SAK auf die mikrobielle Oberfläche rekrutiertes Plasminogen effektiv aktivieren werden. Dieser Mechanismus der Aktivierung ist bisher einzigartig

für Staphylokokken und Streptokokken. Das Protein Aureolysin ist ein zusätzlicher mikrobieller Plasminaktivator von *S. aureus*. Aureolysin wirkt aktivierend auf das uPa, welches dann Plasminogen aktiviert (Beaufort et al. 2008).

Ssl11-gebundenes Plasminogen spaltete nach Aktivierung zum Plasmin das zentrale Komplementprotein C3b proteolytisch in dessen Spaltprodukte. Nach Aktivierung mit SAK spaltete PurA-gebundenes Plasmin C3b ebenfalls. Zum einen wird dadurch das Komplement inhibiert, da das degradierte C3b der Komplementkaskade nicht mehr zur Verfügung steht. Zum anderen wird das Opsonin C3b auf der mikrobiellen Oberfläche eliminiert und dient nicht mehr der Rekrutierung von Phagozyten. Die stärkere Aktivität des Ssl11-gebundenen Plasmins gegenüber dem PurA-gebundenen könnte durch die zweifach höhere Bindeaffinität des Ssl11 zum Plasminogen bedingt sein. Durch die niedrigere Affinität bindet PurA wahrscheinlich weniger Plasminogen und es konnte aufgrunddessen weniger Aktivität detektiert werden. *S. aureus* besitzt jedoch viele Liganden für Plasminogen. Auch durch Sbi und Efb rekrutiertes Plasminogen kann durch die humanen Aktivatoren uPa und SAK effektiv zu Plasmin konvertiert werden. Aktives Plasmin spaltet anschließend die Komplementproteine bzw. Opsonine C3 und C3b, welche ebenfalls von Sbi und Efb gebunden werden können. In der Folge wird die Komplementkaskade unterbrochen und die Immunantwort umgangen (Koch et al. 2012). Auch die PspC-Varianten des *S. pneumoniae* binden Plasmin(ogen), welches im weiteren Verlauf C3b in seine Spaltprodukte zersetzt und so die Komplementkaskade inhibiert (Meinel et al. 2017).

Mikroorganismen nutzen die proteolytische Spaltung von ECM Proteinen und die Degradation von Fibringerinnseinen durch Plasmin zur Gewebsinvasion und Ausbreitung der Erreger im Wirt (Lähteenmäki et al. 2005; Lähteenmäki et al. 2000). Fibrinogen ist die lösliche Vorstufe des Proteins Fibrin, welches durch das Enzym Thrombin gebildet wird. Fibrinfäden sind bei der Koagulation von Bedeutung. Die Fibrinolyse ist ein essentieller Vorgang in der Hämostase und wird durch Plasmin realisiert. Humanes Fibrinogen wurde durch Ssl11- und PurA-gebundenes Plasmin(ogen) nach Aktivierung mit uPa oder SAK gespalten. Zur Evasion des Immunsystems können sich Staphylokokken mit Hilfe einer Fibrinkapsel gegen die humane Immunantwort schützen (Cheng et al. 2010; Guggenberger et al. 2012). Dieser Fibrinwall wird nach Zellvermehrung via mikrobiell rekrutiertem Plasmin wieder abgebaut, um sich im humanen Wirt weiterzuverbreiten (Bergmann und

Hammerschmidt 2007; Lähdenmäki et al. 2000). Die Spaltung von Fibrinogen durch rekrutiertes und aktiviertes Plasmin(ogen) wurde beispielsweise auch für den Erreger *S. pneumoniae* gezeigt, welcher ebenfalls Plasminogen-bindende Proteine exprimiert (Meinel 2017).

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit erhobenen Daten deuten darauf hin, dass Ssl11 und PurA durch die Rekrutierung von aktivierbarem Plasminogen zur Komplementevasion, Gewebsinvasion und generell zur Verbreitung von *S. aureus* im humanen Wirt beitragen. Die beschriebene Rekrutierung von Plasmin(ogen) durch Ssl11 und PurA und die bestehende funktionelle Aktivität der Protease *in vitro* sollte zur Validierung zukünftig in geeigneten *in vivo* Experimenten bestätigt werden.

Ssl11 und PurA sind ferner *S. aureus* Proteine, die sowohl Faktor H, als auch Plasminogen rekrutieren. Auch Sbi und Efb wurden, neben der Plasminogen-Bindung, als Faktor H-rekrutierende Proteine beschrieben (Haupt et al. 2008; Böhm 2013). Somit sind gleich mehrere Staphylokokken Proteine in der Lage, redundant beide Komplementregulatoren zu binden. Dies trifft ebenfalls für das Candida Protein Gpd2 (Luo et al. 2013), Tuf von *S. pneumoniae* (Mohan et al. 2014) und das Faktor H-bindende Protein A (FhbA) von *B. hermsii* zu (Fine et al. 2014). Das mikrobielle Ssl11 rekrutiert zeitgleich Faktor H und Plasminogen. An Tuf von *S. pneumoniae* binden Faktor H und Plasminogen ebenfalls simultan (Mohan et al. 2014). Plasmin kann die Kofaktor-Aktivität von Faktor H für Faktor I verstärken (Barthel et al. 2012a). Im Hinblick darauf könnten Ssl11 und PurA als mikrobielle Proteine, welche beide Regulatoren binden und dies für komplementinhibitorische Funktionen nutzen, in weiterführenden Untersuchungen hinsichtlich einer derartigen verstärkenden Funktion näher charakterisiert werden.

4.3 PurA ist ein *moonlighting* Protein

PurA wurde in dieser Arbeit als Faktor H- und Plasminogen-rekrutierendes Protein identifiziert. Bereits 1997 wurde ein potentieller Einfluss von PurA auf die Virulenz von *S. aureus* gezeigt (Lawrence et al. 1997). Generell sind komplement-inhibitorische Proteine immer extrazellulär bzw. oberflächengebunden oder -assoziiert, sodass die Interaktionen mit Komplementproteinen realisiert werden können. PurA konnte auf der Staphylokokken-Oberfläche nachgewiesen werden (Selle 2015). Mittlerweile sind viele *moonlighting* Proteine bekannt, welche zum einen

Funktionen im Stoffwechsel ausüben und zum anderen oberflächenlokalisiert sind sowie zusätzliche Funktionen, beispielsweise in der Virulenz innehaben (Henderson und Martin 2011). Die komplementinhibierenden Eigenschaften und die Oberflächenlokalisierung charakterisieren PurA einerseits als neu identifiziertes *moonlighting* Protein. Bei PurA handelt es sich andererseits um ein zytosolisches Protein des Purin-Stoffwechsels, die Adenylsuccinat Synthetase (Silva et al. 1995).

Das Protein Tuf von *S. aureus* ist ein multifunktionelles *moonlighting* Protein (Widjaja et al. 2017). Die metabolischen *S. aureus* Proteine Triosephosphat Isomerase und Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase sind gleichermaßen als *moonlighting* Proteine charakterisiert (Furuya und Ikeda 2009; Modun et al. 2000). Das Protein Tuf von *S. pneumoniae* übt Funktionen in der Translation aus und liegt weiterhin sekretiert vor und bindet Komplementregulatoren wie Faktor H, Faktor H-ähnliche Proteine sowie Plasminogen (Mohan et al. 2014). Bis 2014 waren 92 pathogene Spezies bekannt, die Proteine für den Metabolismus, z. B. Glykolyse- und Tricarbonsäurezyklus-Enzyme, Proteasen, Transporter und sogar Chaperone, zudem und zumeist als Virulenzproteine nutzen (Henderson 2014). *Moonlighting* Proteine stellen potentiell nützliche Targets für die Entwicklung von antimikrobiellen Therapeutika dar, da diese mikroorganismusübergreifend wirksam sein können (Henderson 2014).

Aktuelle Studien beschäftigen sich mit der Fragestellung, wie *moonlighting* Proteine an die mikrobielle Oberfläche gelangen. Eine mögliche Antwort lieferten Gil-Bona et al. Sie untersuchten mittels Proteom-Analysen die sekretierten Proteine von *C. albicans*. Im vesikelfreien Sekretom wurden überwiegend klassisch sekretierte Proteine gefunden, die ein N-terminales Signalpeptid aufweisen. In extrazellulären Vesikeln wurden Proteine ohne Signalpeptid gefunden. Einige von ihnen sind bereits als *moonlighting* oder multifunktionale Proteine beschrieben und viele von ihnen haben weiterhin eine Funktion im Metabolismus von *C. albicans* (Gil-Bona et al. 2015). So wurde beispielsweise das Faktor H-bindende Gpm1 in extrazellulären Vesikeln nachgewiesen. Studien zum Proteom von bakteriellen Membranvesikeln demonstrierten, dass die Funktion der in den Vesikeln lokalisierten Proteine zumeist virulenzassoziiert ist bzw. einen Überlebensvorteil für den Erreger darstellt (Bonnington und Kuehn 2014; Schertzer und Whiteley 2013), wie es beispielsweise Toxine tun (Ellis und Kuehn 2010). Weitere Studien könnten Aufschluss darüber

geben, ob Staphylokokken einen ähnlichen Mechanismus des Transports der exprimierten *moonlighting* Proteine, wie z. B. PurA, entwickelt haben.

4.4 Der Komplementinhibitor Ssl11 beeinflusst die Opsonophagozytose

Superantigen-ähnliche Proteine werden von *S. aureus* sekretiert und haben oftmals eine Funktion in der Virulenz des Bakteriums. Ssls enthalten eine Signalsequenz und werden sekretiert. Ssl11 wurde ursprünglich als zellwandassoziiertes Protein von *S. aureus* identifiziert. Dies wird damit erklärt, dass möglicherweise durch eine hohe Expressionsrate des Ssl11 große Mengen des Proteins an der Zellwand assoziiert verblieben (Laughton et al. 2006). In dieser Arbeit wurde die Bindung und Rekrutierung der Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen durch Ssl11 identifiziert. Dies lässt eine neue Hypothese hinsichtlich der Oberflächenlokalisierung des Ssl11 zu, die im Folgenden erklärt wird.

Komplementevasionsproteine auf der Oberfläche der Erreger rekrutieren zum eigenen Schutz humane Regulatoren und entgehen so der Immunantwort. Aufgrund der Erkenntnisse von Laughton et al. (2006) sowie der Identifizierung des Ssl11 als Faktor H- und Plasminogen-bindendes Protein in dieser Arbeit wurde die Lokalisation von Ssl11 untersucht. Poren-induzierter Membranstress bewirkt bei *S. aureus* die Expression von Ssl-Proteinen. Gramicidin, ein antimikrobielles Peptid (AMP), welches die Porenbildung induziert (Benson et al. 2011), wurde dem Nährmedium für die Lokalisationsanalysen des Ssl11 zugesetzt.

Ssl11 war sowohl im Sekretom als auch auf der Zelloberfläche von *S. aureus* vorhanden, nicht aber im Zytosol. Dass sekretierte Proteine an die mikrobielle Oberfläche rückbinden, wurde bereits mehrfach beschrieben, so beispielsweise für das Staphylokokken Protein Efb (Böhm 2013). Der genaue Mechanismus der Bindung von Ssl11 an die Oberfläche ist derzeit noch nicht näher charakterisiert. Es ist daher unklar, ob das Protein direkt während des Sekretionsprozesses an der Oberfläche verbleibt, oder ob es sekretiert wird und zurückbindet. Möglicherweise wird Ssl11 zu Zwecken der Komplementevasion nur zu definierten Zeitpunkten auf der Oberfläche gebunden: die Expression von Ssls wird durch das Zweikomponentensystem SaeRS sowie den Transkriptionsfaktor Rot hochreguliert. Benson et al. (2012) vermuten, dass Ssls *S. aureus* bei geringer bakterieller Zelldichte vor dem angeborenen Immunsystem schützen, bis die Zellzahl hoch genug ist, sodass das virulenzassoziierte Agr Zweikomponentensystem aktiviert wird

(Benson et al. 2012). Durch die Aktivierung von Rot werden Staphylokokken Oberflächenproteine sowie auch Ssls hochreguliert. Diese Kombination befähigt *S. aureus*, an Zellgewebe zu binden und die Opsonisierung und generell die Rekrutierung von Immunzellen zu inhibieren (Benson et al. 2011). Dies zeigt, dass Ssl11 als Oberflächenprotein die Virulenz von *S. aureus* beeinflussen kann.

Oberflächen-gebundenes Ssl11 trägt zur Rekrutierung von Faktor H an die mikrobielle Oberfläche bei. In Abwesenheit von Ssl11 war 10-20 % weniger Faktor H auf der Oberfläche von *S. aureus*, als in Anwesenheit des Proteins. Die Menge an gebundenem Plasminogen war bei An- oder Abwesenheit von Ssl11 nicht signifikant verändert. Dies kann verschiedene Ursachen haben: zum einen ist die Affinität von Ssl11 an Faktor H höher als an Plasminogen, sodass sehr wahrscheinlich mehr Faktor H als Plasminogen von Ssl11 gebunden wird. Zum anderen besitzt *S. aureus* eine Vielzahl von Plasminogen-bindenden Proteinen, die ebenfalls zur Rekrutierung des Plasminogens an die mikrobielle Oberfläche beitragen. Während bereits acht Staphylokokken Proteine bekannt sind, die Plasminogen binden, sind es für Faktor H fünf. Im Vergleich dazu steht das Faktor H-bindende Protein A (FhbA) von *B. hermsii*. FhbA ist ein oberflächenexprimiertes Lipoprotein und bindet, wie der Name sagt, Faktor H und zudem CFHR1 und Plasminogen. Da FhbA das einzige Faktor H-bindende Protein des Erregers ist, ist eine FhbA-Mutante entsprechend nicht mehr befähigt, Faktor H zu binden (Fine et al. 2014). Auf funktioneller Ebene verbleibt im FhbA-Mutantenstamm mehr C3b auf der Zelloberfläche als beim Wildtyp.

Faktor H trägt mit seiner Kofaktor-Aktivität zur Spaltung von C3b bei, das auf Zelloberflächen abgelagert ist. Ein Ssl11-Mutantenstamm, welcher foglich kein Ssl11 mehr exprimierte, wies mehr C3b auf der mikrobiellen Oberfläche auf, als der Referenzstamm, der das Protein Ssl11 exprimierte. Weniger C3b auf der *S. aureus* Oberfläche führt zu verringerter Amplifikation der C3-Konvertase. Dies vermindert die Aktivierung des alternativen Komplementweges. Auch Plasmin ist befähigt, C3b zu spalten. Es ist wahrscheinlich, dass die Rekrutierung von Faktor H und Plasminogen durch Ssl11 zu der beobachteten Verringerung des C3b auf der Oberfläche von *S. aureus* führt. Eine Reduktion von C3b resultiert generell in einer Verringerung des Konvertaseaufbaus und somit in einer geringeren Komplementaktivität. Dies machen sich pathogene Mikroorganismen durch die Rekrutierung humaner Komplement-regulatoren zunutze.

Das C3b ist ein wichtiges Opsonin. Durch Komplementaktivierung abgelagertes C3b markiert die Erreger als körperfremd. Vor allem Neutrophile, welche die Rezeptoren CR1 und CR3 exprimieren, erkennen das C3b auf mikrobiellen Oberflächen und reagieren mit der Phagozytose der Erreger. Auch iC3b, das C3b-Spaltprodukt des Faktor I, fungiert als Opsonin. Verglichen mit C3b wird iC3b jedoch überwiegend von Makrophagen erkannt, welche CR3 und CR4 auf der Oberfläche aufweisen (Wright et al. 1987; Ehlers 2000; Helmy et al. 2006). CR1 erkennt neben C3b auch iC3b, allerdings nur mit geringer Affinität (Krych-Goldberg und Atkinson 2001). Bei der Erkennung von Staphylokokken spielen insbesondere Neutrophile eine große Rolle (van Kessel et al. 2014).

Die durch Ssl11 hervorgerufene Reduktion des abgelagerten Opsonins C3b auf der mikrobiellen Oberfläche lässt eine für Ssls neuartige Strategie der Inhibition der Phagozytose durch Neutrophile vermuten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Ssl11-exprimierende Staphylokokken im Vergleich zu einem Ssl11-Mutantenstamm in geringerem Maße von humanen Neutrophilen phagozytiert werden, wohingegen die Phagozytose durch Makrophagen nicht beeinflusst wurde. Diese ersten Ergebnisse müssen in weiteren Versuchen validiert werden. Ein ähnlicher Effekt auf die Phagozytose durch Neutrophile wurde bereits für das Protein Tef von *C. albicans* sowie PspC von *S. pneumoniae* beschrieben (Meinel 2017; Linden 2017). Für das Oberflächenprotein Fba von *S. pyogenes* wurde ebenfalls eine Resistenz der Mikroorganismen gegenüber Phagozytose (Pandiripally et al. 2002) beschrieben, die durch die Rekrutierung der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 hervorgerufen wurde. Das *S. aureus* Protein Ssl11 bindet und rekrutiert Faktor H und verringert die C3b-Deposition auf der mikrobiellen Oberfläche. Dies verursacht sehr wahrscheinlich den inhibitorischen Effekt auf die Phagozytose durch humane Neutrophile.

Ssl11 blockiert zudem die Anlagerung von Neutrophilen an P-Selektin-tragende Oberflächen und Endothelzellen und trägt zur schnellen Internalisierung in Neutrophile bei (Chung et al. 2007). Evolutiv entwickelten sich diverse Strategien, der Phagozytose durch Neutrophile zu entkommen. Auch weitere Ssls sind in der Inhibition der Phagozytose involviert: Ssl7 bindet IgA und C5 und inhibiert dadurch die Erkennung durch die Phagozyten. Weiterhin inhibiert Ssl7 die Generierung von C5a und somit die Phagozytose und wirkt negativ auf die Produktion von ROS in

Phagozyten (Langley et al. 2005; Bestebroer et al. 2010). Ssl5 bindet ebenfalls an PSGL-1 und inhibiert *in vitro neutrophil rolling* (Bestebroer et al. 2007). Ssl5 bindet zudem G-Protein gekoppelte Rezeptoren am N-Terminus. Damit wird die Aktivierung von Phagozyten durch Zytokine inhibiert (Bestebroer et al. 2009).

4.5 Die Rolle von Ssl11 und PurA als Virulenzproteine *in vivo*

Ssl11 und PurA wurden in dieser Arbeit erstmals als Faktor H und Plasminogen-rekrutierende Proteine identifiziert. Die Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen durch sowohl Ssl11 als auch PurA dient der Rekrutierung regulatorisch aktiver humaner Proteine an die mikrobielle Oberfläche und somit der Komplementevasion. Ob die identifizierten komplementinhibitorischen Eigenschaften von Ssl11 und PurA auch im lebenden Organismus einen Effekt auf die Virulenz von *S. aureus* aufweisen, wurde in der Wachsmottenlarve *G. mellonella* untersucht.

G. mellonella hat eine mit Säugern vergleichbare angeborene Immunantwort und die Eliminierung von Erregern wird ähnlich realisiert (García-Lara et al. 2005; Kavanagh und Reeves 2004). Die Virulenz von Mikroorganismen in der Wachsmottenlarve und in Säugetieren ist zudem vergleichbar. Dies haben auch Studien zu weiteren Nicht-Säuger-Infektionsmodellen gezeigt (Kaito et al. 2002; García-Lara et al. 2005; Seabra und Bhogal 2009). *G. mellonella* wurde bereits in Studien zur Virulenz verschiedener Erreger, darunter auch *S. aureus*, verwendet (Peleg et al. 2009; Gao et al. 2010; Mukherjee et al. 2010). Dabei identifizierten Peleg et al. (2009) erstmals erfolgreich Virulenzgene von *S. aureus* in *G. mellonella*. So ist beispielsweise die Virulenz von *S. aureus* Agr-Mutanten in Säugetier-Modellen attenuiert und eine ähnliche Attenuation ist auch in der Wachsmottenlarve beschrieben (Peleg et al. 2009).

Die Ssl11-Mutante wies gegenüber dem *S. aureus* Wildtyp in *G. mellonella* eine geringfügige Attenuierung auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Ssl11 Einfluss auf die Virulenz von *S. aureus* ausübt. Um dies zu verdeutlichen, müssten ferner Untersuchungen durchgeführt werden, die zum einen zeigen, dass nicht die gegenüber dem Wildtyp aufgezeigte Wachstumsdefizienz für diesen Effekt ursächlich ist. Zum anderen ist eine experimentelle Darlegung des Zusammenhangs zwischen der detektierten Virulenzattenuierung der Ssl11-Mutante und den komplement-inhibitorischen Eigenschaften des Proteins Ssl11 für die Bestätigung der Hypothese essentiell.

Derartige Untersuchungen wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes für das Protein PurA bereits durchgeführt. Eine PurA-Mutante wies im Überlebensversuch mit *G. mellonella* eine starke Attenuierung gegenüber dem *S. aureus* Wildtyp auf. Ähnlich wie die Ssl11-Mutante zeigt auch ein PurA-defizienter *S. aureus* Stamm eine Wachstumsdefizienz (Selle 2015). Dieser hätte durch die eingeschränkte Purin-Biosynthese hervorgerufen sein können. Dr. Selle konnte jedoch zeigen, dass die Reduktion des Wachstums nicht für die verminderte Virulenz der PurA-Mutante ursächlich ist: das *pur* Operon, in dem das Gen *purA* kodiert ist, beinhaltet weitere elf Gene. Alle exprimierten Pur-Proteine sind an der Purin-Biosynthese beteiligt. Es wurden *S. aureus* Stämme mit Insertionsmutanten in allen elf Genen erstellt. Die elf Pur-Insertionsmutanten wurden hinsichtlich ihres Wachstums sowie ihrer Virulenz in *G. mellonella* untersucht. Während die Mutantenstämme $\Delta purA$, $\Delta purF$, $\Delta purH$, $\Delta purK$, $\Delta purL$ und $\Delta purS$ gegenüber dem Wildtyp eine Wachstumsdefizienz aufwiesen, zeigte lediglich $\Delta purA$ eine ausgeprägte Virulenzattenuierung. Die verminderte Virulenz von PurA-defizienten Staphylokokken wurde weiterhin in einem murinen Lungeninfektionsmodell sowie einem murinen systemischen Infektionsmodell nachgewiesen (Selle 2015). Ein PurA-defizienter *Edwardsiella ictaluri* wies ebenfalls eine hohe Virulenzattenuierung auf (Lawrence et al. 1997).

Ob die Inhibition des Komplements ursächlich für den nachgewiesenen Virulenzeffekt von PurA ist, muss, wie auch für Ssl11, in zukünftigen Studien näher charakterisiert werden.

4.6 Fazit

In dieser Doktorarbeit werden die zwei *S. aureus* Proteine Ssl11 und PurA erstmalig als Komplementevasionsproteine identifiziert und hinsichtlich ihrer Evasionsstrategien charakterisiert. Ssl11 und PurA binden sowohl den humanen Komplementregulator Faktor H als auch den Komplement- und Koagulationsregulator Plasminogen. Ssl11 ist somit das einzige Ssl-Protein, für das eine Interaktion mit Faktor H und Plasminogen beschrieben ist. Ssl11 bindet Faktor H über einen neuartigen Mechanismus. Die identifizierte Oberflächenlokalisierung von Ssl11 und PurA auf der mikrobiellen Oberfläche realisiert eine Rekrutierung der humanen Regulatoren und charakterisiert PurA als ein *moonlighting* Protein. Faktor H sowie auch Plasmin(ogen) erhalten im Komplex mit Ssl11 oder PurA ihre funktionelle Aktivität. Faktor H vermittelt als Kofaktor für Faktor I die Spaltung von komplementaktivem C3b zu iC3b. Mikrobiell gebundenes Plasminogen wird nicht nur durch humane Aktivatoren sondern auch durch die mikrobiell exprimierte Staphylokinase zum proteolytischen Plasmin aktiviert. Das aktive Plasmin spaltet das Komplementprotein C3b. Durch den Abbau des Plasmaproteins Fibrinogen trägt mikrobiell rekrutiertes aktives Plasmin zur Ausbreitung von *S. aureus* im humanen Organismus bei. Die durch Ssl11 verursachte Verringerung der Opsonisierung der Staphylokokken führt zu einer reduzierten Phagozytose von *S. aureus* durch humane Neutrophile. Die Evasion des Komplements durch die Rekrutierung von Faktor H und Plasminogen durch Ssl11 und PurA trägt potentiell zum Überleben des Erregers *S. aureus* im menschlichen Wirt bei. Eine für die Ssl11-Mutante geringe und für die PurA-Mutante sehr potente Attenuierung der Virulenz im *G. mellonella*-Modell ist ein erster Hinweis auf eine Funktion für Ssl11 und PurA als *S. aureus* Virulenzproteine in einem lebenden Organismus (**Abb. 4.1**). Diese Arbeit identifiziert Ssl11 und PurA als neue Komplementevasionsproteine von *S. aureus* und liefert somit eine Basis für das Verständnis des komplexen Zusammenspiels der diversen Virulenzproteine des Erregers, dessen Ergründung für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe gegen *S. aureus* essentiell ist.

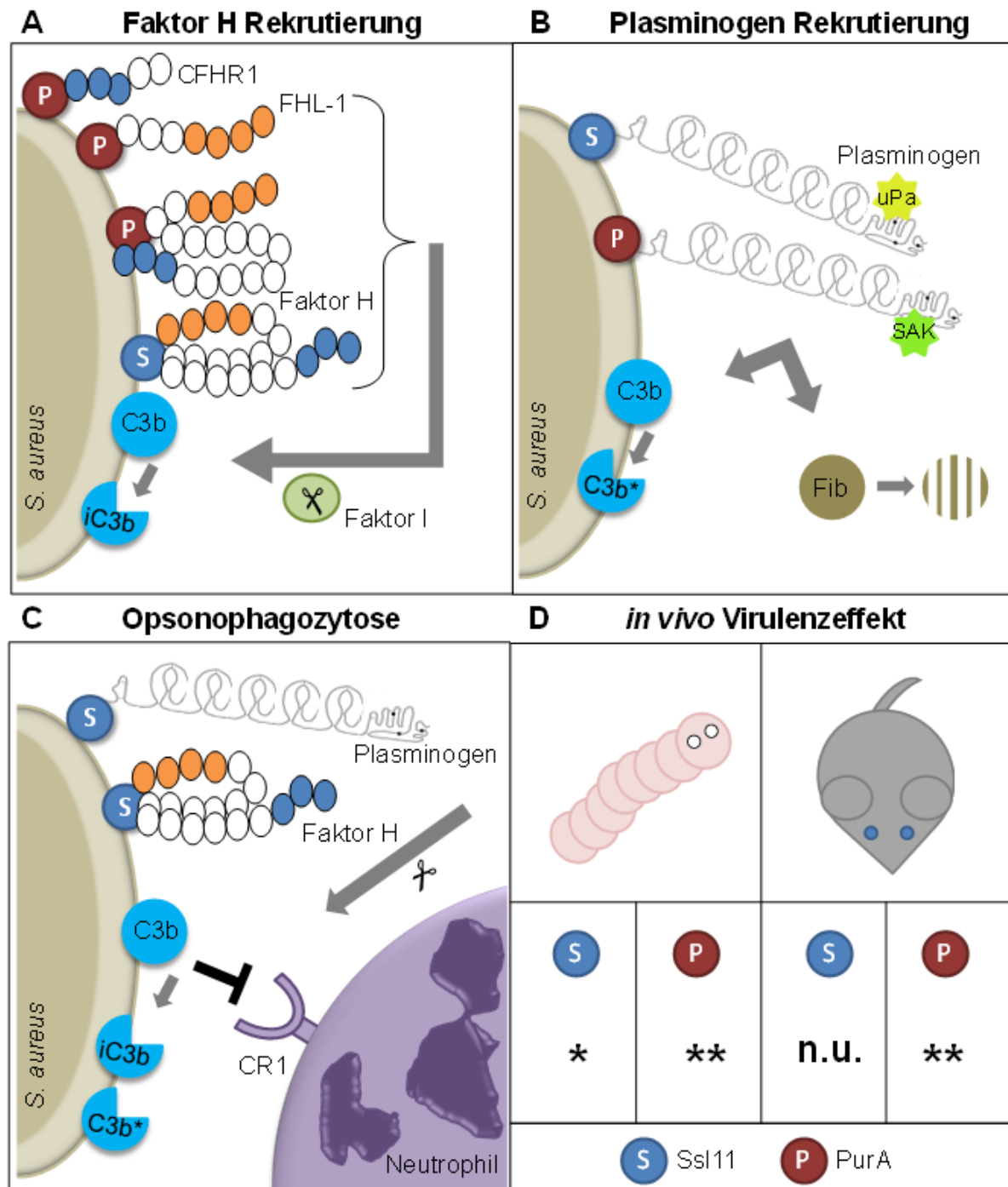


Abbildung 4.1: Ssl11 und PurA sind Komplementevasionsproteine von *S. aureus* und haben Einfluss auf die Virulenz. **A** Die an der Oberfläche von *S. aureus* lokalisierten Proteine Ssl11 und PurA binden Faktor H. PurA bindet zudem FHL-1 und CFHR1. Durch Komplementaktivierung kommt es zur Ablagerung von humanem C3b auf der bakteriellen Oberfläche. Rekrutierter Faktor H sowie FHL-1 fungieren als aktive Kofaktoren für die Protease Faktor I. Diese spaltet in Anwesenheit der rekrutierten Kofaktoren das C3b in iC3b. **B** Ssl11 und PurA rekrutieren neben Faktor H auch Plasminogen an die Oberfläche von *S. aureus*. Plasminogen wird durch uPa oder SAK zu Plasmin aktiviert und spaltet dann sowohl abgelagertes C3b als auch Fibrinogen. **C** Ssl11 kann zeitgleich Faktor H und Plasminogen binden. Die Rekrutierung der Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen durch Ssl11 verursacht eine verringerte C3b-Deposition auf der Staphylokokken-Oberfläche. Infolgedessen ist auch die Phagozytose von *S. aureus* durch neutrophile Granulozyten verringert. **D** In vivo weist die Ssl11-Mutante eine leichte Virulenzattenuierung in *G. mellonella* auf. Die Virulenz des PurA-defizienten *S. aureus* Stammes ist sowohl in *G. mellonella* als auch in einem murinen Infektionsmodell attenuiert. Dies deutet auf eine Funktion von Ssl11 und PurA in der Virulenz von *S. aureus* hin. n.u. = nicht untersucht.

Literaturverzeichnis

- Agarwal, V.; Kuehn, M. J.; Fulde, M.; Riesbeck, K.; Bergmann, S.; Blom, A. M. (2013): *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen- and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (10), S. 6849–6863. DOI: 10.1074/jbc.M112.405530.
- Al-Shangiti, A. M.; Naylor, C. E.; Nair, S. P.; Briggs, D. C.; Henderson, B.; Chain, B. M. (2004): Structural relationships and cellular tropism of staphylococcal superantigen-like proteins. In: *Infection and Immunity* 72 (7), S. 4261–4270. DOI: 10.1128/IAI.72.7.4261-4270.2004.
- Amdahl; Jongerius, I.; Meri, T.; Pasanen, T.; Hyvarinen, S.; Haapasalo, K. et al. (2013): Staphylococcal Ecb protein and host complement regulator factor H enhance functions of each other in bacterial immune evasion. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191 (4), S. 1775–1784. DOI: 10.4049/jimmunol.1300638.
- Antikainen, J.; Kuparinen, V.; Lambert, D. G.; Korhonen, T. K. (2007): Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits. In: *FEMS immunology and medical microbiology* 51 (3), S. 526–534. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00330.x.
- Arcus, V. L.; Langley, R.; Proft, T.; Fraser, J. D.; Baker, E. N. (2002): The Three-dimensional structure of a superantigen-like protein, SET3, from a pathogenicity island of the *Staphylococcus aureus* genome. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (35), S. 32274–32281. DOI: 10.1074/jbc.M203914200.
- Atkins, K. L.; Burman, J. D.; Chamberlain, E. S.; Cooper, J. E.; Poutrel, B.; Bagby, S. et al. (2008): *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi. Host specificity and mechanisms of immune complex formation. In: *Molecular immunology* 45 (6), S. 1600–1611. DOI: 10.1016/j.molimm.2007.10.021.
- Baba, T.; Bae, T.; Schneewind, O.; Takeuchi, F.; Hiramatsu, K. (2008): Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes. Polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. In: *Journal of bacteriology* 190 (1), S. 300–310. DOI: 10.1128/JB.01000-07.
- Baker, H. M.; Basu, I.; Chung, M. C.; Caradoc-Davies, T.; Fraser, J. D.; Baker, E. N. (2007): Crystal structures of the staphylococcal toxin SSL5 in complex with sialyl Lewis X reveal a conserved binding site that shares common features with viral and bacterial sialic acid binding proteins. In: *Journal of molecular biology* 374 (5), S. 1298–1308. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.09.091.
- Bardoel, B. W.; Vos, R.; Bouman, T.; Aerts, P. C.; Bestebroer, J.; Huizinga, E. G. et al. (2012): Evasion of Toll-like receptor 2 activation by staphylococcal superantigen-like protein 3. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 90 (10), S. 1109–1120. DOI: 10.1007/s00109-012-0926-8.
- Barthel, D.; Schindler, S.; Zipfel, P. F. (2012a): Plasminogen is a complement inhibitor. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (22), S. 18831–18842. DOI: 10.1074/jbc.M111.323287.
- Barthel, D.; Singh, B.; Riesbeck, K.; Zipfel, P. F. (2012b): *Haemophilus influenzae* uses the surface protein E to acquire human plasminogen and to evade innate immunity. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (1), S. 379–385. DOI: 10.4049/jimmunol.1101927.
- Beaufort, N.; Wojciechowski, P.; Sommerhoff, C. P.; Szmyd, G.; Dubin, G.; Eick, S. et al. (2008): The human fibrinolytic system is a target for the staphylococcal metalloprotease aureolysin. In: *The Biochemical journal* 410 (1), S. 157–165. DOI: 10.1042/BJ20070650.
- Benson, M. A.; Lilo, S.; Nygaard, T.; Voyich, J. M.; Torres, V. J. (2012): Rot and SaeRS cooperate to activate expression of the staphylococcal superantigen-like exoproteins. In: *Journal of bacteriology* 194 (16), S. 4355–4365. DOI: 10.1128/JB.00706-12.
- Benson, M. A.; Lilo, S.; Wasserman, G. A.; Thoendel, M.; Smith, A.; Horswill, A. R. et al. (2011): *Staphylococcus aureus* regulates the expression and production of the staphylococcal superantigen-like secreted proteins in a Rot-dependent manner. In: *Molecular microbiology* 81 (3), S. 659–675. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07720.x.

- Berends, E. T. M.; Dekkers, J. F.; Nijland, R.; Kuipers, A.; Soppe, J. A.; van Strijp, J. A. G.; Rooijackers, S. H. M. (2013): Distinct localization of the complement C5b-9 complex on Gram-positive bacteria. In: *Cellular microbiology* 15 (12), S. 1955–1968. DOI: 10.1111/cmi.12170.
- Berends, E. T. M.; Horswill, A. R.; Haste, N. M.; Monestier, M.; Nizet, V.; Köckritz-Blickwede, M. von (2010): Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. In: *Journal of innate immunity* 2 (6), S. 576–586. DOI: 10.1159/000319909.
- Berge, A.; Sjöbring, U. (1993): PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (34), S. 25417–25424.
- Bergmann, S.; Hammerschmidt, S. (2007): Fibrinolysis and host response in bacterial infections. In: *Thrombosis and haemostasis* 98 (3), S. 512–520.
- Bergmann, S.; Schoenen, H.; Hammerschmidt, S. (2013): The interaction between bacterial enolase and plasminogen promotes adherence of *Streptococcus pneumoniae* to epithelial and endothelial cells. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 303 (8), S. 452–462. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.06.002.
- Bestebroer, J.; Aerts, P. C.; Rooijackers, S. H. M.; Pandey, M. K.; Köhl, J.; van Strijp, J. A. G.; de Haas, C. J. C. (2010): Functional basis for complement evasion by staphylococcal superantigen-like 7. In: *Cellular microbiology* 12 (10), S. 1506–1516. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01486.x.
- Bestebroer, J.; Poppelier, M. J. J. G.; Ulfman, L. H.; Lenting, P. J.; Denis, C. V.; van Kessel, K. P. M. et al. (2007): Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. In: *Blood* 109 (7), S. 2936–2943. DOI: 10.1182/blood-2006-06-015461.
- Bestebroer, J.; van Kessel, K. P. M.; Azouagh, H.; Walenkamp, A. M.; Boer, I. G. J.; Romijn, R. A. et al. (2009): Staphylococcal SSL5 inhibits leukocyte activation by chemokines and anaphylatoxins. In: *Blood* 113 (2), S. 328–337. DOI: 10.1182/blood-2008-04-153882.
- Bishop, J. R.; Gagneux, P. (2007): Evolution of carbohydrate antigens--microbial forces shaping host glycomes? In: *Glycobiology* 17 (5), 23R-34R. DOI: 10.1093/glycob/cwm005.
- Blackmore, T. K.; Hellwage, J.; Sadlon, T. A.; Higgs, N.; Zipfel, P. F.; Ward, H. M.; Gordon, D. L. (1998): Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160 (7), S. 3342–3348.
- Blackmore, T. K.; Sadlon, T. A.; Ward, H. M.; Lublin, D. M.; Gordon, D. L. (1996): Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157 (12), S. 5422–5427.
- Blom, A. M.; Villoutreix, B. O.; Dahlbäck, B. (2004): Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? In: *Molecular immunology* 40 (18), S. 1333–1346. DOI: 10.1016/j.molimm.2003.12.002.
- Böhm S (2013): Immune evasion proteins from *Staphylococcus aureus* and therapeutic evaluation of staphylococcal complement- controlling proteins. Friedrich Schiller Universität Jena
- Bokarewa, M. I.; Jin, T.; Tarkowski, A. (2006): *Staphylococcus aureus*. Staphylokinase. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 38 (4), S. 504–509. DOI: 10.1016/j.biocel.2005.07.005.
- Bonnington, K. E.; Kuehn, M. J. (2014): Protein selection and export via outer membrane vesicles. In: *Biochimica et biophysica acta* 1843 (8), S. 1612–1619. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.011.
- Brinkmann, V.; Zychlinsky, A. (2012): Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? In: *The Journal of cell biology* 198 (5), S. 773–783. DOI: 10.1083/jcb.201203170.
- Brisette, C. A.; Haupt, K.; Barthel, D.; Cooley, A. E.; Bowman, A.; Skerka, C. et al. (2009): *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. In: *Infection and Immunity* 77 (1), S. 300–306. DOI: 10.1128/IAI.01133-08.
- Brown, S.; Santa Maria, J. P.; Walker, S. (2013): Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. In: *Annual review of microbiology* 67, S. 313–336. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155620.
- Burman, Julia D.; Leung, Elisa; Atkins, Karen L.; O'Seaghdha, Maghnus N.; Lango, Lea; Bernado, Pau et al. (2008): Interaction of human complement with Sbi, a staphylococcal immunoglobulin-binding protein. Indications of a novel mechanism of complement evasion by *Staphylococcus aureus*. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (25), S. 17579–17593. DOI: 10.1074/jbc.M800265200.

- Castellino, F. J.; McCance, S. G. (1997): The kringle domains of human plasminogen. In: *Ciba Foundation symposium* 212, 46-60; discussion 60-5.
- Cedergren, L.; Andersson, R.; Jansson, B.; Uhlén, M.; Nilsson, B. (1993): Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1. In: *Protein engineering* 6 (4), S. 441–448.
- Cesarman-Maus, G.; Hajjar, K. A. (2005): Molecular mechanisms of fibrinolysis. In: *British journal of haematology* 129 (3), S. 307–321. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.
- Chen, Q.; Manzke, M.; Hartmann, A.; Buttner, M.; Amann, K.; Pauly, D. et al. (2016): Complement Factor H-Related 5-Hybrid Proteins Anchor Properdin and Activate Complement at Self-Surfaces. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 27 (5), S. 1413–1425. DOI: 10.1681/ASN.2015020212.
- Cheng, A. G.; McAdow, M.; Kim, Hwan K.; Bae, T.; Missiakas, D. M.; Schneewind, O. (2010): Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. In: *PLoS pathogens* 6 (8), e1001036. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001036.
- Cheung, A. L.; Schmidt, K.; Bateman, B.; Manna, A. C. (2001): SarS, a SarA homolog repressible by agr, is an activator of protein A synthesis in *Staphylococcus aureus*. In: *Infection and Immunity* 69 (4), S. 2448–2455. DOI: 10.1128/IAI.69.4.2448-2455.2001.
- Chung, M. C.; Wines, B. D.; Baker, H.; Langley, R. J.; Baker, E. N.; Fraser, J. D. (2007): The crystal structure of staphylococcal superantigen-like protein 11 in complex with sialyl Lewis X reveals the mechanism for cell binding and immune inhibition. In: *Molecular microbiology* 66 (6), S. 1342–1355. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05989.x.
- Clark, E. A.; Crennell, S.; Upadhyay, A.; Zozulya, A. V.; Mackay, J. D.; Svergun, D. I. et al. (2011): A structural basis for Staphylococcal complement subversion: X-ray structure of the complement-binding domain of *Staphylococcus aureus* protein Sbi in complex with ligand C3d. In: *Molecular immunology* 48 (4), S. 452–462. DOI: 10.1016/j.molimm.2010.09.017.
- Clarke, S. R.; Foster, S. J. (2006): Surface Adhesins of *Staphylococcus aureus*. In: Robert K. Poole (Hg.): *Advances in Microbial Physiology*, Bd. 51. 1. Aufl. s.l.: Elsevier textbooks (Advances in Microbial Physiology, 51), S. 187–224.
- Davis, A. E.; Mejia, P.; Lu, F. (2008): Biological activities of C1 inhibitor. In: *Molecular immunology* 45 (16), S. 4057–4063. DOI: 10.1016/j.molimm.2008.06.028.
- Dobrina, A. (2002): Cytolytically inactive terminal complement complex causes transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo. In: *Blood* 99 (1), S. 185–192. DOI: 10.1182/blood.V99.1.185.
- Dossett, J. H.; Kronvall, G.; Williams, R. C.; Quie, P. G. (1969): Antiphagocytic effects of staphylococcal protein A. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 103 (6), S. 1405–1410.
- DuMont, A. L.; Yoong, P.; Surewaard, B. G. J.; Benson, M. A.; Nijland, R.; van Strijp, J A. G.; Torres, V. J. (2013): *Staphylococcus aureus* elaborates leukocidin AB to mediate escape from within human neutrophils. In: *Infection and Immunity* 81 (5), S. 1830–1841. DOI: 10.1128/IAI.00095-13.
- Dunkelberger, J. R.; Song, W-C (2010): Complement and its role in innate and adaptive immune responses. In: *Cell research* 20 (1), S. 34–50. DOI: 10.1038/cr.2009.139.
- Dunman, P. M.; Murphy, E.; Haney, S.; Palacios, D.; Tucker-Kellogg, G.; Wu, S. et al. (2001): Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. In: *Journal of bacteriology* 183 (24), S. 7341–7353. DOI: 10.1128/JB.183.24.7341-7353.2001.
- Eberhardt, H. U.; Buhlmann, D.; Hortschansky, P.; Chen, Q.; Böhm, S.; Kemper, M. J. et al. (2013): Human factor H-related protein 2 (CFHR2) regulates complement activation. In: *PloS one* 8 (11), e78617. DOI: 10.1371/journal.pone.0078617.
- Ehlers, M. R. (2000): CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. In: *Microbes and infection* 2 (3), S. 289–294.
- Ehrlich P: Die Wertbestimmung des Diphterieresums. Über die Antitoxinwirkung: Theorie der Immunität 1897, *Klinisches Jahrbuch* 6: 299–326.

- Ellis, T. N.; Kuehn, M. J. (2010): Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 74 (1), S. 81–94. DOI: 10.1128/MMBR.00031-09.
- Esser, A. F. (1994): The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity. In: *Toxicology* 87 (1-3), S. 229–247.
- Fearon, D. T. (1975): Properdin. Binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. In: *The Journal of experimental medicine* 142 (4), S. 856–863. DOI: 10.1084/jem.142.4.856.
- Fearon, D. T. (1978): Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (4), S. 1971–1975.
- Ferreira, V. P.; Herbert, A. P.; Hocking, H. G.; Barlow, P. N.; Pangburn, M. K. (2006): Critical role of the C-terminal domains of factor H in regulating complement activation at cell surfaces. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (9), S. 6308–6316.
- Fine, L. M.; Miller, D. P.; Mallory, K. L.; Tegels, B. K.; Earnhart, C. G.; Marconi, R. T. (2014): The *Borrelia hermsii* factor H binding protein FhbA is not required for infectivity in mice or for resistance to human complement in vitro. In: *Infection and Immunity* 82 (8), S. 3324–3332. DOI: 10.1128/IAI.01892-14.
- Fleury, C.; Su, Y-C; Hallström, T.; Sandblad, L.; Zipfel, P. F.; Riesbeck, K. (2014): Identification of a *Haemophilus influenzae* factor H-Binding lipoprotein involved in serum resistance. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (12), S. 5913–5923. DOI: 10.4049/jimmunol.1303449.
- Foster, T. (1998): Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. In: *Trends in microbiology* 6 (12), S. 484–488. DOI: 10.1016/S0966-842X(98)01400-0.
- Foster, T. J. (2004): The *Staphylococcus aureus* "superbug". In: *The Journal of clinical investigation* 114 (12), S. 1693–1696. DOI: 10.1172/JCI23825.
- Foster, T. J. (2005): Immune evasion by staphylococci. In: *Nature reviews. Microbiology* 3 (12), S. 948–958. DOI: 10.1038/nrmicro1289.
- Fraser, J. D.; Proft, T. (2008): The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. In: *Immunological reviews* 225, S. 226–243. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00681.x.
- Fridkin, S. K.; Hageman, J. C.; Morrison, M.; Sanza, L. T.; Como-Sabetti, K.; Jernigan, J. A. et al. (2005): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. In: *The New England journal of medicine* 352 (14), S. 1436–1444. DOI: 10.1056/NEJMoa043252.
- Fritsche, L. G.; Lauer, N.; H, Andrea; Stippa, S.; Keilhauer, C. N.; Oppermann, M. et al. (2010): An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). In: *Human molecular genetics* 19 (23), S. 4694–4704. DOI: 10.1093/hmg/ddq399.
- Fuchs, H.; Wallich, R.; Simon, M. M.; Kramer, M. D. (1994): The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (26), S. 12594–12598.
- Furuya, H.; Ikeda, R. (2009): Interaction of triosephosphate isomerase from the cell surface of *Staphylococcus aureus* and alpha-(1-3)-mannooligosaccharides derived from glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. In: *Microbiology (Reading, England)* 155 (Pt 8), S. 2707–2713. DOI: 10.1099/mic.0.028068-0.
- Gaboriaud, C.; Thielens, N. M.; Gregory, L. A.; Rossi, V.; Fontecilla-Camps, J. C.; Arlaud, G. J. (2004): Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. In: *Trends in immunology* 25 (7), S. 368–373. DOI: 10.1016/j.it.2004.04.008.
- Gao, W.; Chua, K.; Davies, J. K.; Newton, H. J.; Seemann, T.; Harrison, P. F. et al. (2010): Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. In: *PLoS pathogens* 6 (6), e1000944. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000944.
- García-Lara, J.; Needham, A. J.; Foster, S. J. (2005): Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host-pathogen interaction. In: *FEMS immunology and medical microbiology* 43 (3), S. 311–323. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.11.003.

- Geiger, T.; Goerke, C.; Mainiero, M.; Kraus, D.; Wolz, C. (2008): The virulence regulator Sae of *Staphylococcus aureus*: promoter activities and response to phagocytosis-related signals. In: *Journal of bacteriology* 190 (10), S. 3419–3428. DOI: 10.1128/JB.01927-07.
- Geisinger, E.; Muir, T. W.; Novick, R. P. (2009): agr receptor mutants reveal distinct modes of inhibition by staphylococcal autoinducing peptides. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (4), S. 1216–1221. DOI: 10.1073/pnas.0807760106.
- Gil-Bona, A.; Llama-Palacios, A.; Parra, C. M.; Vivanco, F.; Nombela, C.; Monteoliva, L.; Gil, C. (2015): Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. In: *Journal of proteome research* 14 (1), S. 142–153. DOI: 10.1021/pr5007944.
- Giraud, A. T.; Martinez, G. L.; Calzolari, A.; Nagel, R. (1994): Characterization of a Tn925-induced mutant of *Staphylococcus aureus* altered in exoprotein production. In: *Journal of basic microbiology* 34 (5), S. 317–322.
- Gordon, D. L.; Kaufman, R. M.; Blackmore, T. K.; Kwong, J.; Lublin, D. M. (1995): Identification of complement regulatory domains in human factor H. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155 (1), S. 348–356.
- Gould, I. M. (2005): The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *The Journal of hospital infection* 61 (4), S. 277–282. DOI: 10.1016/j.jhin.2005.06.014.
- Grundmann, H.; Aires-de-Sousa, M.; Boyce, J.; Tiemersma, E. (2006): Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. In: *The Lancet* 368 (9538), S. 874–885. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68853-3.
- Guggenberger, C.; Wolz, C.; Morrissey, J. A.; Heesemann, J. (2012): Two distinct coagulase-dependent barriers protect *Staphylococcus aureus* from neutrophils in a three dimensional in vitro infection model. In: *PLoS pathogens* 8 (1), e1002434. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002434.
- Haas, P.-J.; van Strijp, J. (2007): Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation. In: *Immunologic research* 37 (3), S. 161–175.
- Haas, C. J. C. de; Veldkamp, K. E.; Peschel, A.; Weerkamp, F.; van Wamel, W. J. B.; Heezius, Erik C. J. M. et al. (2004): Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. In: *The Journal of experimental medicine* 199 (5), S. 687–695. DOI: 10.1084/jem.20031636.
- Hair, P. S.; Ward, M. D.; Semmes, O. J.; Foster, T. J.; Cunnion, K. M. (2008): *Staphylococcus aureus* clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b. In: *The Journal of infectious diseases* 198 (1), S. 125–133. DOI: 10.1086/588825.
- Hallström, T.; Haupt, K.; Kraiczy, P.; Hortschansky, P.; Wallich, R.; Skerka, C.; Zipfel, P. F. (2010): Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen. In: *The Journal of infectious diseases* 202 (3), S. 490–498. DOI: 10.1086/653825.
- Hammel, M.; Sfyroera, G.; Ricklin, D.; Magotti, P.; Lambris, J. D.; Geisbrecht, B. V. (2007): A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*. In: *Nature immunology* 8 (4), S. 430–437. DOI: 10.1038/ni1450.
- Harris, L. G.; Foster, S. J.; Richards, R. G. (2002): An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials. Review. In: *eCM* 4, S. 39–60. DOI: 10.22203/eCM.v004a04.
- Haspel, N.; Ricklin, D.; Geisbrecht, B. V.; Kavraki, L. E.; Lambris, J. D. (2008): Electrostatic contributions drive the interaction between *Staphylococcus aureus* protein Efb-C and its complement target C3d. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 17 (11), S. 1894–1906. DOI: 10.1110/ps.036624.108.
- Haupt, K.; Reuter, M.; van den Elsen, J.; Burman, J.; Hälbich, S.; Richter, J. et al. (2008): The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement Factor H and C3b. In: *PLoS pathogens* 4 (12), e1000250. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000250.
- Hebecker, M.; Józsi, M. (2012): Factor H-related protein 4 activates complement by serving as a platform for the assembly of alternative pathway C3 convertase via its interaction with C3b protein. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (23), S. 19528–19536. DOI: 10.1074/jbc.M112.364471.

- Heinen, S.; Hartmann, A.; Lauer, N.; Wiehl, U.; Dahse, H-M; Schirmer, S. et al. (2009): Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. In: *Blood* 114 (12), S. 2439–2447. DOI: 10.1182/blood-2009-02-205641.
- Hellwage, J.; Jokiranta, T. S.; Koistinen, V.; Vaarala, O.; Meri, S.; Zipfel, P. F. (1999): Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. In: *FEBS Letters* 462 (3), S. 345–352.
- Helmy, K. Y.; Katschke, K. J.; Gorgani, N. N.; Kljavin, N. M.; Elliott, J. M.; Diehl, L. et al. (2006): CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. In: *Cell* 124 (5), S. 915–927. DOI: 10.1016/j.cell.2005.12.039.
- Henderson, B. (2014): An overview of protein moonlighting in bacterial infection. In: *Biochemical Society transactions* 42 (6), S. 1720–1727. DOI: 10.1042/BST20140236.
- Henderson, B.; Martin, A. (2011): Bacterial virulence in the moonlight. Multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. In: *Infection and Immunity* 79 (9), S. 3476–3491. DOI: 10.1128/IAI.00179-11.
- Hermans, S. J.; Baker, H. M.; Sequeira, R. P.; Langley, R. J.; Baker, E. N.; Fraser, J. D. (2012): Structural and functional properties of staphylococcal superantigen-like protein 4. In: *Infection and Immunity* 80 (11), S. 4004–4013. DOI: 10.1128/IAI.00764-12.
- Higgins, J.; Loughman, A.; van Kessel, K P. M.; van Strijp, J A. G.; Foster, T. J. (2006): Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. In: *FEMS microbiology letters* 258 (2), S. 290–296. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00229.x.
- Hourcade, D. E. (2006): The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (4), S. 2128–2132. DOI: 10.1074/jbc.M508928200.
- Huber-Lang, M.; Sarma, J. V.; Zetoune, F. S.; Rittirsch, D.; Neff, T. A.; McGuire, S. R. et al. (2006): Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. In: *Nature medicine* 12 (6), S. 682–687. DOI: 10.1038/nm1419.
- Irmscher, S.; Döring, N.; Halder, L. D.; Jo, E. A. H.; Kopka, I.; Dunker, C. et al. (2017): Kallikrein Cleaves C3 and Activates Complement. In: *Journal of innate immunity*. DOI: 10.1159/000484257.
- Itoh, S.; Hamada, E.; Kamoshida, G.; Yokoyama, R.; Takii, T.; Onozaki, K.; Tsuji, T. (2010): Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to human immunoglobulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway. In: *Molecular immunology* 47 (4), S. 932–938. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.09.027.
- Jokiranta, T. S.; Hellwage, J.; Koistinen, V.; Zipfel, P. F.; Meri, S. (2000): Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (36), S. 27657–27662. DOI: 10.1074/jbc.M002903200.
- Jokiranta, T. S.; Zipfel, P. F.; Hakulinen, J.; Kühn, S.; Pangburn, M. K.; Tamerius, J. D.; Meri, S. (1996): Analysis of the recognition mechanism of the alternative pathway of complement by monoclonal anti-factor H antibodies: evidence for multiple interactions between H and surface bound C3b. In: *FEBS Letters* 393 (2-3), S. 297–302.
- Jongerijs, I.; Köhl, J.; Pandey, M. K.; Ruyken, M.; van Kessel, K P. M.; van Strijp, J A. G.; Rooijackers, S. H. M. (2007): Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (10), S. 2461–2471. DOI: 10.1084/jem.20070818.
- Jozsi, M.; Zipfel, P. F. (2008): Factor H family proteins and human diseases. In: *Trends in immunology* 29 (8), S. 380–387. DOI: 10.1016/j.it.2008.04.008.
- Kaito, C.; Akimitsu, N.; Watanabe, H.; Sekimizu, K. (2002): Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. In: *Microbial pathogenesis* 32 (4), S. 183–190. DOI: 10.1006/mpat.2002.0494.
- Kavanagh, K.; Reeves, E. P. (2004): Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. In: *FEMS microbiology reviews* 28 (1), S. 101–112. DOI: 10.1016/j.femsre.2003.09.002.
- Khera, R.; Das, N. (2009): Complement Receptor 1: disease associations and therapeutic implications. In: *Molecular immunology* 46 (5), S. 761–772. DOI: 10.1016/j.molimm.2008.09.026.

- Kimberley, F. C.; Sivasankar, B.; Morgan, P. B. (2007): Alternative roles for CD59. In: *Molecular immunology* 44 (1-3), S. 73–81. DOI: 10.1016/j.molimm.2006.06.019.
- Kloppot, P.; Selle, M.; Kohler, C.; Stentzel, S.; Fuchs, S.; Liebscher, V. et al. (2015): Microarray-based identification of human antibodies against *Staphylococcus aureus* antigens. In: *Proteomics. Clinical applications* 9 (11-12), S. 1003–1011. DOI: 10.1002/prca.201400123.
- Kluytmans, J.; van Belkum, A.; Verbrugh, H. (1997): Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. In: *Clinical microbiology reviews* 10 (3), S. 505–520.
- Ko, Y-P; Kuipers, A.; Freitag, C. M.; Jongerius, I.; Medina, E.; van Rooijen, W. J. et al. (2013): Phagocytosis escape by a *Staphylococcus aureus* protein that connects complement and coagulation proteins at the bacterial surface. In: *PLoS pathogens* 9 (12), e1003816. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003816.
- Kobayashi, S. D.; Braughton, K. R.; Palazzolo-Ballance, A. M.; Kennedy, A. D.; Sampaio, E.; Kristosturyan, E. et al. (2010): Rapid neutrophil destruction following phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of innate immunity* 2 (6), S. 560–575. DOI: 10.1159/000317134.
- Koch, T. K.; Reuter, M.; Barthel, D.; Böhm, S.; van den Elsen, J.; Kraiczy, P. et al. (2012): *Staphylococcus aureus* proteins Sbi and Efb recruit human plasmin to degrade complement C3 and C3b. In: *PloS one* 7 (10), e47638. DOI: 10.1371/journal.pone.0047638.
- Kolaczowska, E.; Kubes, P. (2013): Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (3), S. 159–175. DOI: 10.1038/nri3399.
- Kraiczy, P.; Rossmann, E.; Brade, V.; Simon, M. M.; Skerka, C.; Zipfel, P. F.; Wallich, Reinhard (2006): Binding of human complement regulators FHL-1 and factor H to CRASP-1 orthologs of *Borrelia burgdorferi*. In: *Wiener klinische Wochenschrift* 118 (21-22), S. 669–676. DOI: 10.1007/s00508-006-0691-1.
- Kristensen, T.; Tack, B. F. (1986): Murine protein H is comprised of 20 repeating units, 61 amino acids in length. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (11), S. 3963–3967.
- Krych-Goldberg, M.; Atkinson, J. P. (2001): Structure-function relationships of complement receptor type 1. In: *Immunological reviews* 180, S. 112–122.
- Kunert, A.; Losse, J.; Gruszyn, C.; Hühn, M.; Kaendler, K.; Mikkat, S. et al. (2007): Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (5), S. 2979–2988.
- Lähteenmäki, K.; Edelman, S.; Korhonen, T. K. (2005): Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. In: *Trends in microbiology* 13 (2), S. 79–85. DOI: 10.1016/j.tim.2004.12.003.
- Lähteenmäki, K.; Kuusela, P.; Korhonen, T. K. (2000): Plasminogen activation in degradation and penetration of extracellular matrices and basement membranes by invasive bacteria. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 21 (2), S. 125–132. DOI: 10.1006/meth.2000.0983.
- Lähteenmäki, K.; Kuusela, P.; Korhonen, T. K. (2001): Bacterial plasminogen activators and receptors. In: *FEMS microbiology reviews* 25 (5), S. 531–552.
- Langley, R.; Patel, D.; Jackson, N.; Clow, F.; Fraser, J. D. (2010): Staphylococcal superantigen superdomains in immune evasion. In: *Critical reviews in immunology* 30 (2), S. 149–165.
- Langley, R.; Wines, B.; Willoughby, N.; Basu, I.; Proft, T.; Fraser, J. D. (2005): The Staphylococcal Superantigen-Like Protein 7 Binds IgA and Complement C5 and Inhibits IgA-Fc RI Binding and Serum Killing of Bacteria. In: *The Journal of Immunology* 174 (5), S. 2926–2933. DOI: 10.4049/jimmunol.174.5.2926.
- Laughton, J. M.; Devillard, E.; Heinrichs, D. E.; Reid, G.; McCormick, J. K. (2006): Inhibition of expression of a staphylococcal superantigen-like protein by a soluble factor from *Lactobacillus reuteri*. In: *Microbiology (Reading, England)* 152 (Pt 4), S. 1155–1167. DOI: 10.1099/mic.0.28654-0.
- Laursen, N. S.; Gordon, N.; Hermans, S.; Lorenz, N.; Jackson, N.; Wines, B. et al. (2010): Structural basis for inhibition of complement C5 by the SSL7 protein from *Staphylococcus aureus*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (8), S. 3681–3686. DOI: 10.1073/pnas.0910565107.

- Lawrence, M. L.; Cooper, R. K.; Thune, R. L. (1997): Attenuation, persistence, and vaccine potential of an *Edwardsiella ictaluri purA* mutant. In: *Infection and Immunity* 65 (11), S. 4642–4651.
- Linden J (2017): Tef1 ist ein multifaktorielles Protein von *Candida albicans* und moduliert die angeborene und adaptive Immunreaktion. Friedrich Schiller Universität Jena
- Lopez, C. M.; Wallich, R.; Riesbeck, K.; Skerka, C.; Zipfel, P. F. (2014): *Candida albicans* uses the surface protein Gpm1 to attach to human endothelial cells and to keratinocytes via the adhesive protein vitronectin. In: *PloS one* 9 (3), e90796. DOI: 10.1371/journal.pone.0090796.
- Lowy, F. D. (2003): Antimicrobial resistance. The example of *Staphylococcus aureus*. In: *J. Clin. Invest.* 111 (9), S. 1265–1273. DOI: 10.1172/JCI200318535.
- Lueong, S. S.; Hoheisel, J. D.; Alhamdani, M. S. S. (2014): Protein Microarrays as Tools for Functional Proteomics. Achievements, Promises and Challenges. In: *J Proteomics Bioinform* 07 (04). DOI: 10.4172/jpb.S7-004.
- Luo, S.; Hoffmann, R.; Skerka, C.; Zipfel, P. F. (2013): Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 is a novel factor H-, factor H-like protein 1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. In: *The Journal of infectious diseases* 207 (4), S. 594–603. DOI: 10.1093/infdis/jis718.
- Luo, S.; Poltermann, S.; Kunert, A.; Rupp, S.; Zipfel, P. F. (2009): Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. In: *Molecular immunology* 47 (2-3), S. 541–550. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.07.017.
- Luo, Shanshan; Hippler, Uta-Christina; Münzberg, Christin; Skerka, Christine; Zipfel, Peter F. (2015): Sequence variations and protein expression levels of the two immune evasion proteins Gpm1 and Pra1 influence virulence of clinical *Candida albicans* isolates. In: *PloS one* 10 (2), e0113192. DOI: 10.1371/journal.pone.0113192.
- Mandell, G. L. (1975): Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. *In vitro* and *in vivo* studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. In: *The Journal of clinical investigation* 55 (3), S. 561–566. DOI: 10.1172/JCI107963.
- Markiewski, M. M.; Nilsson, B.; Ekdahl, K. N.; Mollnes, T. E.; Lambris, J. D. (2007): Complement and coagulation: strangers or partners in crime? In: *Trends in immunology* 28 (4), S. 184–192. DOI: 10.1016/j.it.2007.02.006.
- Mayadas, T. N.; Cullere, X.; Lowell, C. A. (2014): The multifaceted functions of neutrophils. In: *Annual review of pathology* 9, S. 181–218. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
- McNamara, P. J.; Milligan-Monroe, K. C.; Khalili, S.; Proctor, R. A. (2000): Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of bacteriology* 182 (11), S. 3197–3203.
- McRae, Jennifer L.; Duthy, Thomas G.; Griggs, Kim M.; Ormsby, Rebecca J.; Cowan, Peter J.; Cromer, Brett A. et al. (2005): Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (10), S. 6250–6256.
- Meinel, C.; Spartà, G.; Dahse, H-M; Hörhold, F.; König, R.; Westermann, M. et al. (2017): *Streptococcus pneumoniae* From Patients With Hemolytic Uremic Syndrome Binds Human Plasminogen via the Surface Protein PspC and Uses Plasmin to Damage Human Endothelial Cells. In: *The Journal of infectious diseases*. DOI: 10.1093/infdis/jix305.
- Meinel C (2017): *Streptococcus pneumoniae* von Patienten mit hämolytischurämischem Syndrom schädigen Endothelzellen durch aktiviertes Plasmin und inhibieren das Komplementsystem. Friedrich Schiller Universität Jena
- Miyashita, C.; Wenzel, E.; Heiden, M. (1988): Plasminogen: a brief introduction into its biochemistry and function. In: *Haemostasis* 18 Suppl 1, S. 7–13.
- Modun, B.; Morrissey, J.; Williams, P. (2000): The staphylococcal transferrin receptor. A glycolytic enzyme with novel functions. In: *Trends in microbiology* 8 (5), S. 231–237.
- Mohan, S.; Hertweck, C.; Dudda, A.; Hammerschmidt, S.; Skerka, C.; Hallström, T.; Zipfel, P. F. (2014): Tuf of *Streptococcus pneumoniae* is a surface displayed human complement regulator binding protein. In: *Molecular immunology* 62 (1), S. 249–264. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.06.029.

- Mölkänen, T.; Tyynelä, J.; Helin, J.; Kalkkinen, N.; Kuusela, P. (2002): Enhanced activation of bound plasminogen on *Staphylococcus aureus* by staphylokinase. In: *FEBS Letters* 517 (1-3), S. 72–78. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)02580-2.
- Mollnes, T. E.; Brekke, O-L; Fung, M.; Fure, H.; Christiansen, D.; Bergseth, G. et al. (2002): Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. In: *Blood* 100 (5), S. 1869–1877.
- Montgomery, C. P.; Boyle-Vavra, S.; Daum, R. S. (2010): Importance of the global regulators Agr and SaeRS in the pathogenesis of CA-MRSA USA300 infection. In: *PloS one* 5 (12), e15177. DOI: 10.1371/journal.pone.0015177.
- Mukherjee, K.; Altincicek, B.; Hain, T.; Domann, E.; Vilcinskas, A.; Chakraborty, T. (2010): *Galleria mellonella* as a model system for studying Listeria pathogenesis. In: *Applied and environmental microbiology* 76 (1), S. 310–317. DOI: 10.1128/AEM.01301-09.
- Nanra, J. S.; Buitrago, S. M.; Crawford, S.; Ng, J.; Fink, P. S.; Hawkins, J. et al. (2013): Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. In: *Human vaccines & immunotherapeutics* 9 (3), S. 480–487.
- Nordahl, E. A.; Rydengård, V.; Nyberg, P.; Nitsche, D. P.; Mörgelin, M.; Malmsten, M. et al. (2004): Activation of the complement system generates antibacterial peptides. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (48), S. 16879–16884. DOI: 10.1073/pnas.0406678101.
- Novick, R. P.; Geisinger, E. (2008): Quorum sensing in staphylococci. In: *Annual review of genetics* 42, S. 541–564. DOI: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091640.
- Nygaard, T. K.; Pallister, K. B.; Ruzevich, P.; Griffith, S.; Vuong, C.; Voyich, J. M. (2010): SaeR binds a consensus sequence within virulence gene promoters to advance USA300 pathogenesis. In: *The Journal of infectious diseases* 201 (2), S. 241–254. DOI: 10.1086/649570.
- Okada, K.; Ueshima, S.; Tanaka, M.; Fukao, H.; Matsuo, O. (2000): Analysis of plasminogen activation by the plasmin-staphylokinase complex in plasma of alpha2-antiplasmin-deficient mice. In: *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 11 (7), S. 645–655.
- Önder, Ö.; Humphrey, P. T.; McOmber, B.; Korobova, F.; Francella, N.; Greenbaum, D. C.; Brisson, D. (2012): OspC is potent plasminogen receptor on surface of *Borrelia burgdorferi*. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (20), S. 16860–16868. DOI: 10.1074/jbc.M111.290775.
- Oppermann, M.; Manuelian, T.; Jozsi, M.; Brandt, E.; Jokiranta, T. S.; Heinen, S. et al. (2006): The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition. Evidence for a compact conformation of the native protein. In: *Clinical and experimental immunology* 144 (2), S. 342–352. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03071.x.
- O'Riordan, K.; Lee, J. C. (2004): *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. In: *Clinical microbiology reviews* 17 (1), S. 218–234. DOI: 10.1128/CMR.17.1.218-234.2004.
- Pandiripally, V.; Gregory, E.; Cue, D. (2002): Acquisition of regulators of complement activation by *Streptococcus pyogenes* serotype M1. In: *Infection and Immunity* 70 (11), S. 6206–6214.
- Pangburn, M. K.; Müller-Eberhard, H. J. (1978): Complement C3 convertase: cell surface restriction of beta1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (5), S. 2416–2420.
- Panton, P. N.; Valentine, F.C.O. (1932): staphylococcal toxin. In: *The Lancet* 219 (5662), S. 506–508. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)24468-7.
- Patel, D.; Wines, B. D.; Langley, R. J.; Fraser, J. D. (2010): Specificity of staphylococcal superantigen-like protein 10 toward the human IgG1 Fc domain. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (11), S. 6283–6292. DOI: 10.4049/jimmunol.0903311.
- Peacock, S. J.; Silva, i. de; Lowy, F. D. (2001): What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? In: *Trends in microbiology* 9 (12), S. 605–610. DOI: 10.1016/S0966-842X(01)02254-5.
- Peerschke, E. I. B.; Yin, W.; Ghebrehiwet, B. (2008): Platelet mediated complement activation. In: *Advances in experimental medicine and biology* 632, S. 81–91.

- Peetermans, M.; Vanassche, T.; Liesenborghs, L.; Claes, J.; Vande Velde, G.; Kwiecinski, J. et al. (2014): Plasminogen activation by staphylokinase enhances local spreading of *S. aureus* in skin infections. In: *BMC microbiology* 14, S. 310. DOI: 10.1186/s12866-014-0310-7.
- Peiser L (2009): Phagocytosis: Enhancement. In: Chichester: John Wiley & Sons Ltd, DOI: 10.1002/9780470015902.a0001214.pub3
- Peleg, a. Y.; Monga, d.; Pillai, s.; Mylonakis, E.; Moellering, R. C.; Eliopoulos, G. M. (2009): Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. In: *The Journal of infectious diseases* 199 (4), S. 532–536. DOI: 10.1086/596511.
- Perkins, S. J.; Goodship, T. H. J. (2002): Molecular modelling of the C-terminal domains of factor H of human complement: a correlation between haemolytic uraemic syndrome and a predicted heparin binding site. In: *Journal of molecular biology* 316 (2), S. 217–224. DOI: 10.1006/jmbi.2001.5337.
- Peterson, P. K.; Verhoef, J.; Sabath, L. D.; Quie, P. G. (1977): Effect of protein A on staphylococcal opsonization. In: *Infection and Immunity* 15 (3), S. 760–764.
- Peterson, P. K.; Wilkinson, B. J.; Kim, Y.; Schmeling, D.; Douglas, S. D.; Quie, P. G.; Verhoef, J. (1978): The key role of peptidoglycan in the opsonization of *Staphylococcus aureus*. In: *The Journal of clinical investigation* 61 (3), S. 597–609. DOI: 10.1172/JCI108971.
- Pietrocola, G.; Nobile, G.; Gianotti, V.; Zapotoczna, M.; Foster, T. J.; Geoghegan, J. A.; Speziale, P. (2016): Molecular Interactions of Human Plasminogen with Fibronectin-binding Protein B (FnBPB), a Fibrinogen/Fibronectin-binding Protein from *Staphylococcus aureus*. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (35), S. 18148–18162. DOI: 10.1074/jbc.M116.731125.
- Pilsczek, F. H.; Salina, D.; Poon, K. K. H.; Fahey, C.; Yipp, B. G.; Sibley, C. D. et al. (2010): A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (12), S. 7413–7425. DOI: 10.4049/jimmunol.1000675.
- Poltermann, S.; Kunert, A.; Heide, M. von der; Eck, r.; Hartmann, A.; Zipfel, P. F. (2007): Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (52), S. 37537–37544. DOI: 10.1074/jbc.M707280200.
- Postma, b.; Poppelier, m. J.; van Galen, j. C.; Prossnitz, e. R.; van Strijp, J A. G.; de Haas, C J. C.; van Kessel, K P. M. (2004): Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172 (11), S. 6994–7001.
- Preissner, K. T.; Seiffert, D. (1998): Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. In: *Thrombosis Research* 89 (1), S. 1–21.
- Prescott, S. (1998): Review articles. In: *The Review of English Studies* 49 (195), S. 331–335. DOI: 10.1093/res/49.195.331.
- Queck, S. Y.; Jameson-Lee, M.; Villaruz, A. E.; Bach, T-h L.; Khan, B. A.; Sturdevant, D. E. et al. (2008): RNAlII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. In: *Molecular cell* 32 (1), S. 150–158. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.08.005.
- Ramsland, P. A.; Willoughby, N.; Trist, H. M.; Farrugia, W.; Hogarth, P. M.; Fraser, J. D.; Wines, B. D. (2007): Structural basis for evasion of IgA immunity by *Staphylococcus aureus* revealed in the complex of SSL7 with Fc of human IgA1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (38), S. 15051–15056. DOI: 10.1073/pnas.0706028104.
- Ricklin, D.; Hajishengallis, G.; Yang, K.; Lambris, J. D. (2010): Complement. A key system for immune surveillance and homeostasis. In: *Nature immunology* 11 (9), S. 785–797. DOI: 10.1038/ni.1923.
- Ripoche, J.; Day, A. J.; Harris, T. J.; Sim, R. B. (1988): The complete amino acid sequence of human complement factor H. In: *The Biochemical journal* 249 (2), S. 593–602.
- Rogers, D. E.; Tompsett, R. (1952): The survival of staphylococci within human leukocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 95 (2), S. 209–230.
- Rooijackers, S. H. M.; Ruyken, M.; Roos, A.; Daha, M. R.; Presanis, J. S.; Sim, R. B. et al. (2005a): Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. In: *Nature immunology* 6 (9), S. 920–927. DOI: 10.1038/ni1235.

- Rooijackers, S. H. M.; van Wamel, W. J. B.; Ruyken, M.; van Kessel, K. P. M.; van Strijp, J. A. G. (2005b): Anti-opsonic properties of staphylokinase. In: *Microbes and infection* 7 (3), S. 476–484. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.12.014.
- Saïd-Salim, B.; Dunman, P. M.; McAleese, F. M.; Macapagal, D.; Murphy, E.; McNamara, P. J. et al. (2003): Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. In: *Journal of bacteriology* 185 (2), S. 610–619.
- Salazar, N.; Castiblanco-Valencia, M. M.; da Silva, L. B.; Castro, I. A. de; Monaris, D.; Masuda, H. P. et al. (2014): *Staphylococcus aureus* manganese transport protein C (MntC) is an extracellular matrix- and plasminogen-binding protein. In: *PloS one* 9 (11), e112730. DOI: 10.1371/journal.pone.0112730.
- Sanderson-Smith, M. L.; Dowton, M.; Ranson, M.; Walker, M. J. (2007): The plasminogen-binding group A streptococcal M protein-related protein Prp binds plasminogen via arginine and histidine residues. In: *Journal of bacteriology* 189 (4), S. 1435–1440. DOI: 10.1128/JB.01218-06.
- Schertzer, J. W.; Whiteley, M. (2013): Bacterial outer membrane vesicles in trafficking, communication and the host-pathogen interaction. In: *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 23 (1-2), S. 118–130. DOI: 10.1159/000346770.
- Seabra, R.; Bhogal, N. (2009): Hospital infections, animal models and alternatives. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 28 (6), S. 561–568. DOI: 10.1007/s10096-008-0680-6.
- Selle, M. (2015): Interaktionen zwischen sekretierten Proteinen von *Staphylococcus aureus* und der Immunantwort des Wirtes. Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Seya, T.; Atkinson, J. P. (1989): Functional properties of membrane cofactor protein of complement. In: *The Biochemical journal* 264 (2), S. 581–588.
- Sharma, A. K.; Pangburn, M. K. (1996): Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (20), S. 10996–11001.
- Sharp, J. A.; Echague, C. G.; Hair, P. S.; Ward, M. D.; Nyalwidhe, J. O.; Geoghegan, J. A. et al. (2012): *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic. In: *PloS one* 7 (5), e38407. DOI: 10.1371/journal.pone.0038407.
- Silhavy, T. J.; Kahne, D.; Walker, S. (2010): The bacterial cell envelope. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (5), a000414. DOI: 10.1101/cshperspect.a000414.
- Silva, M. M.; Poland, B. W.; Hoffman, C. R.; Fromm, H. J.; Honzatko, R. B. (1995): Refined crystal structures of unligated adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli*. In: *Journal of molecular biology* 254 (3), S. 431–446. DOI: 10.1006/jmbi.1995.0629.
- Six, A.; Bellais, S.; Bouaboud, A.; Fouet, A.; Gabriel, C.; Tazi, A. et al. (2015): Srr2, a multifaceted adhesin expressed by ST-17 hypervirulent Group B *Streptococcus* involved in binding to both fibrinogen and plasminogen. In: *Molecular microbiology* 97 (6), S. 1209–1222. DOI: 10.1111/mmi.13097.
- Smith, E. J.; Visai, L.; Kerrigan, S. W.; Speziale, P.; Foster, T. J. (2011): The Sbi protein is a multifunctional immune evasion factor of *Staphylococcus aureus*. In: *Infection and Immunity* 79 (9), S. 3801–3809. DOI: 10.1128/IAI.05075-11.
- Smyth, D. S.; Kafer, J. M.; Wasserman, G. A.; Velickovic, L.; Mathema, B.; Holzman, R. S. et al. (2012): Nasal carriage as a source of agr-defective *Staphylococcus aureus* bacteremia. In: *The Journal of infectious diseases* 206 (8), S. 1168–1177. DOI: 10.1093/infdis/jis483.
- Somers, W. S.; Tang, J.; Shaw, G. D.; Camphausen, R. T. (2000): Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. In: *Cell* 103 (3), S. 467–479.
- Sottrup-Jensen, L.; Zajdel, M.; Claeys, H.; Petersen, T. E.; Magnusson, S. (1975): Amino-acid sequence of activation cleavage site in plasminogen: homology with "pro" part of prothrombin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (7), S. 2577–2581.
- Spitzer, D.; Mitchell, L. M.; Atkinson, J. P.; Hourcade, D. E. (2007): Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (4), S. 2600–2608.

- Tedesco, F.; Pausa, M.; Nardon, E.; Introna, M.; Mantovani, A.; Dobrina, A. (1997): The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. In: *The Journal of experimental medicine* 185 (9), S. 1619–1627.
- Tegmark, K.; Karlsson, A.; Arvidson, S. (2000): Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. In: *Molecular microbiology* 37 (2), S. 398–409.
- Thakker, M.; Park, J. S.; Carey, V.; Lee, J. C. (1998): *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. In: *Infection and Immunity* 66 (11), S. 5183–5189.
- Tseng, C. W.; Stewart, G. C. (2005): Rot repression of enterotoxin B expression in *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of bacteriology* 187 (15), S. 5301–5309. DOI: 10.1128/JB.187.15.5301-5309.2005.
- Turnberg, D.; Botto, M. (2003): The regulation of the complement system: insights from genetically-engineered mice. In: *Molecular immunology* 40 (2-4), S. 145–153.
- Upadhyay, A.; Burman, J. D.; Clark, E. A.; Leung, E.; Isenman, D. E.; van den Elsen, J. M. H.; Bagby, S. (2008): Structure-function analysis of the C3 binding region of *Staphylococcus aureus* immune subversion protein Sbi. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (32), S. 22113–22120. DOI: 10.1074/jbc.M802636200.
- van Kessel, K. P. M.; Bestebroer, J.; van Strijp, J. A. G. (2014): Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 467. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00467.
- Voyich, J. M.; Braughton, K. R.; Sturdevant, D. E.; Whitney, A. R.; Saïd-Salim, B.; Porcella, S. F. et al. (2005): Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (6), S. 3907–3919.
- Voyich, J. M.; Vuong, C.; DeWald, M.; Nygaard, T. K.; Kocianova, S.; Griffith, S. et al. (2009): The SaeR/S gene regulatory system is essential for innate immune evasion by *Staphylococcus aureus*. In: *The Journal of infectious diseases* 199 (11), S. 1698–1706. DOI: 10.1086/598967.
- Walport, M. J. (2001a): Complement. First of two parts. In: *The New England journal of medicine* 344 (14), S. 1058–1066. DOI: 10.1056/NEJM200104053441406.
- Walport, M. J. (2001b): Complement. Second of two parts. In: *The New England journal of medicine* 344 (15), S. 1140–1144. DOI: 10.1056/NEJM200104123441506.
- Wang, H.; Lottenberg, R.; Boyle, M. D.P. (1995): Analysis of the interaction of group A streptococci with fibrinogen, streptokinase and plasminogen. In: *Microbial pathogenesis* 18 (3), S. 153–166. DOI: 10.1016/S0882-4010(95)90013-6.
- Watts, A.; Ke, D.; Wang, Q.; Pillay, A.; Nicholson-Weller, A.; Lee, J. C. (2005): *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. In: *Infection and Immunity* 73 (6), S. 3502–3511. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3502-3511.2005.
- Wertheim, H. F. L.; Melles, D. C.; Vos, M. C.; van Leeuwen, W.; van Belkum, A.; Verbrugh, H. A.; Nouwen, J. L. (2005): The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. In: *The Lancet. Infectious diseases* 5 (12), S. 751–762. DOI: 10.1016/S1473-3099(05)70295-4.
- Wertheim, H. F. L.; Vos, M. C.; Ott, A.; van Belkum, A.; Voss, A.; Kluytmans, J. A. J. W. et al. (2004): Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. In: *Lancet (London, England)* 364 (9435), S. 703–705. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16897-9.
- Wetsel, R. A. (1995): Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors. In: *Current opinion in immunology* 7 (1), S. 48–53.
- Widjaja, M.; Harvey, K. L.; Hagemann, L.; Berry, I. J.; Jarocki, V. M.; Raymond, B. B. A. et al. (2017): Elongation factor Tu is a multifunctional and processed moonlighting protein. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 11227. DOI: 10.1038/s41598-017-10644-z.
- Wright, S. D.; Reddy, P. A.; Jong, M. T.; Erickson, B. W. (1987): C3bi receptor (complement receptor type 3) recognizes a region of complement protein C3 containing the sequence Arg-Gly-Asp. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (7), S. 1965–1968.

Zhang, L.; Jacobsson, K.; Vasi, J.; Lindberg, M.; Frykberg, L. (1998): A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*. In: *Microbiology (Reading, England)* 144 (Pt 4), S. 985–991. DOI: 10.1099/00221287-144-4-985.

Zipfel, P. F.; Hallström, T.; Riesbeck, K. (2013): Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes—tipping the balance. In: *Molecular immunology* 56 (3), S. 152–160. DOI: 10.1016/j.molimm.2013.05.222.

Zipfel, P. F.; Heinen, S.; Józsi, M.; Skerka, C. (2006): Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. In: *Molecular immunology* 43 (1-2), S. 97–106. DOI: 10.1016/j.molimm.2005.06.015.

Zipfel, P. F.; Skerka, C. (1999): FHL-1/reconectin. A human complement and immune regulator with cell-adhesive function. In: *Immunology Today* 20 (3), S. 135–140. DOI: 10.1016/S0167-5699(98)01432-7.

Zipfel, P. F.; Skerka, C. (2009): Complement regulators and inhibitory proteins. In: *Nature reviews. Immunology* 9 (10), S. 729–740. DOI: 10.1038/nri2620.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Die vorliegende Dissertation wurde von mir selbst angefertigt und alle verwendeten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit vermerkt.

Alle Personen, die mich bei der Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskriptes unterstützt haben, sind von mir benannt.

Ich habe keinen Promotionsberater in Anspruch genommen. Zudem erhielten von mir keine Dritten unmittelbare oder mittelbar geldwerte Leistungen, welche im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde nicht als Prüfungsleistung für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Von mir wurde keine identische oder abgeänderte Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 20.03.2018

Anika Westphal

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anika Westphal
Geburtsdatum/ -ort	17.11.1988/ Teterow
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Berufliche Tätigkeit

seit 11/ 2016	Universitätsklinikum Jena, Experimentelle Nephrologie Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin
---------------	---

Promotionsstudium

seit 10/ 2013	Friedrich-Schiller-Universität Jena Promotionsstudium im Bereich Mikrobiologie Mitglied der <i>International Leibniz Research School for Microbial and Biomolecular Interactions</i> (ILRS) Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V. – Hans-Knöll-Institut Dissertationsprojekt: „ <i>Die Funktion von Ssl11 und PurA von Staphylococcus aureus bei der Komplementevasion</i> “ in der Abteilung Infektionsbiologie bei Prof. Dr. Peter F. Zipfel
---------------	---

Studium

10/ 2008 - 09/ 2013	Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald Studiengang Humanbiologie Hauptfach Mikrobiologie/ Virologie Diplomarbeit: „ <i>Charakterisierung von Virulenzfaktoren in Staphylococcus aureus</i> “ Abschluss als Diplom Humanbiologe (1,7)
---------------------	---

Schulausbildung

1999 - 2008	Gymnasium Altentreptow Abschluss: Abitur (1,6)
-------------	---

Jena, den 20.03.2018

Anika Westphal

Konferenzbeiträge und Publikationen

Vorträge

- 05/ 2016 *ILRS and GRK 1870 Joint Meeting*, Lutherstadt Wittenberg
„Complement evasion of S. aureus: CRASP8 is a novel Factor H and plasminogen binding protein“
A. Westphal, M. Selle, P. Kloppot, K. Ohlsen, S. Engelmann, P. F. Zipfel
- 09/ 2015 *67th Annual Meeting of the German Society of Hygiene and Microbiology (DGHM)*, Münster
“Novel insights into Factor H acquisition by Staphylococcus aureus”
A. Westphal, M. Selle, P. Kloppot, K. Ohlsen, S. Engelmann, P. F. Zipfel
- 05/ 2014 *7th ILRS Symposium*, Jena
“Novel complement evasion strategies of Staphylococcus aureus”
A. Westphal, M. Selle, P. Kloppot, K. Ohlsen, S. Engelmann, P. F. Zipfel
- 04/ 2014 *MiCom 2014, 4th international student conference on microbial communication*, Jena
“CRASP7 and CRASP8- two novel complement evasion proteins of Staphylococcus aureus”
A. Westphal, M. Selle, P. Kloppot, K. Ohlsen, S. Engelmann, P. F. Zipfel

Poster

- 09/ 2017 *8. Sepsis Kongress der Deutschen Sepsis-Gesellschaft (DSG)*, Weimar
„TLR-expressing cells as biosensor for bacterial ligands“
S. Reuter, K. Herold, A. Westphal, C. Sponholz, M. Bauer, R. Mrowka
- 09/ 2017 *9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN)*, Mannheim
„Induzierbares Renin in einer Zelllinie mit modifizierter Cas9“
S. Reuter, A. Westphal, G. B. Wolf, R. Mrowka
- 09/ 2016 *International Conference on the Pathophysiology of Staphylococci*, Tübingen
“Investigating complement escape of Staphylococcus aureus via Factor H and plasminogen recruitment”
A. Westphal, M. Selle, P. Kloppot, K. Ohlsen, S. Engelmann, P. F. Zipfel

- 03/ 2016 Jahrestagung 2016 der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Jena
„Identification of a new immune evasion protein of the human pathogen Staphylococcus aureus“
A. Westphal, M. Selle, P. Kloppot, K. Ohlsen, S. Engelmann, P. F. Zipfel
- 05/ 2015 8th ILRS Symposium, Jena
“Novel identified staphylococcal CRASP variants bind human complement regulator Factor H for immune evasion”
A. Westphal, M. Selle, P. Kloppot, K. Ohlsen, S. Engelmann, P. F. Zipfel
- 04/ 2015 MiCom 2015, 5th international student conference on microbial communication, Jena
“Complement evasion strategies of novel identified Factor H binding proteins of Staphylococcus aureus”
A. Westphal, M. Selle, P. Kloppot, K. Ohlsen, S. Engelmann, P. F. Zipfel

Publikationen

- 08/ 2017 A. Westphal , S. Reuter , R. Mrowka
Nephropathies, *Acta Physiologica*

Danksagung

Mein Dank geht an dieser Stelle an all jene, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und mich auf dem Weg zur Dissertation begleitet haben.

Ich danke Prof. Peter Zipfel für die Möglichkeit, meine Promotion in der Abteilung Infektionsbiologie durchzuführen. Ihm und Prof. Christine Skerka danke ich zudem für die fachliche und wissenschaftliche Unterstützung, konstruktive Gespräche sowie die vielen Möglichkeiten, meine Ergebnisse auf Konferenzen zu präsentieren.

Mein Dank geht weiterhin an Dr. Christine Vogler für die Organisation vieler inspirierender ILRS-Symposien und die Hilfe in allen organisatorischen Belangen. Zudem danke ich meinen ILRS-Betreuern Prof. Andreas Henke und Prof. Markus Nett für ihre Unterstützung und die inspirierenden Gespräche.

Ich danke meinen Kooperationspartnern Prof. Susanne Engelmann und Dr. Peggy Kloppot für die fachliche Unterstützung und Hilfe mit den Proteinarrays. PD Dr. Knut Ohlsen danke ich für die vielen konstruktiven Gespräche und die Möglichkeit, Versuche in seinen Laboren durchzuführen. Ich danke Dr. Martina Selle für den fachlichen Austausch, das zur Verfügung gestellte PurA-Protein und die Unterstützung bei den *G. mellonella* Versuchen. Mein Dank gilt ebenso Dr. Tobias Hertlein für die Durchführung von *G. mellonella* Experimenten (und all den Gallerien, die für diese Dissertation ihr Leben ließen).

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung Infektionsbiologie für die wunderbare, herzliche Arbeitsatmosphäre, die Gemeinschaft und die entgegengebrachte Unterstützung. Mein Dank gilt insbesondere Justus Linden, der mich von der ersten Minute an begleitet hat, mir stets Vorbild und Motivation war und mich immer wieder mit seinen kulinarischen Ergüssen überrascht hat. Dr. Hans-Martin Dahse danke ich für seine Hilfe bei den Phagozytose-Versuchen, für sein stets offenes Ohr und viele sonnige Stunden im Garten. Ich danke Dr. Teresia Hallström für die vielseitige Hilfe zu Beginn des Projektes und für ihre Power und ihr Lachen, die immer ansteckend waren. Luke D. Halder danke ich für die Hilfe am LSM und ihm und Mahmoud Abdel Fatah gilt mein Dank für diverse zur Verfügung gestellte Neutrophilen-Fraktionen. Hervorheben möchte ich weiterhin Susanne Ackermann, Heike Gäbler, Andrea Hartmann, Christian Meinel, Sarah Irmischer, Denise Buhlmann, Ramona Rudnick, Nadine Reiher und Andre Frühauf. Danke für eure Hilfe in wissenschaftlichen und

organisatorischen Belangen und für die vielen schönen Stunden auch außerhalb des Labores.

Danke an alle fleißigen Korrekturleser für ihre konstruktiven Hinweise.

Ich bedanke mich weiterhin bei meinen Freunden, insbesondere Marie und Antonia, die immer für mich da waren, immer ein offenes Ohr hatten und stets ein willkommener Ausgleich zum Labor waren. Ich danke Mats, Hector, Theo und Malte für ihre Fröhlichkeit und die wunderschöne gemeinsame Zeit außerhalb des Institutes.

Ein großes Dankeschön gilt auch all meinen WG-Mitbewohnern, vor allem Hagen und Natalie für das warme Willkommen in Jena, für zahlreiche schöne gemeinsame Stunden und das herzliche Miteinander, was die Zeit der Doktorarbeit in Jena zu einer besonderen gemacht hat.

Meinen Kollegen aus der Experimentellen Nephrologie und meinem Freund Michél danke ich für die vielen motivierenden Worte und die Rückenstärkung während des Schreibprozesses.

Final gilt mein Dank insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder Erik, die mich stets unterstützt haben, immer für mich da waren und mir das Studium und die darauffolgende Promotion überhaupt erst ermöglicht haben.